



Univerzita Karlova v Praze
1.lékařská fakulta



Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie

**Úloha oxidačního stresu v patogenezi
metabolického syndromu a jeho komplikací**

**The role of oxidative stress in the pathogenesis of metabolic syndrome and its
complications**

Disertační práce

Mgr. Hana Malínská

školitel : RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

IV.interní klinika 1.lékařská fakulta Univerzita Karlova v Praze

školitel konzultant: Ing. Ludmila Kazdová, CSc.

Oddělení metabolismu diabetu

Institut klinické a experimentální medicíny v Praze

Praha 2010

OBSAH

1. ÚVOD	3
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
2.1. Metabolický syndrom – definice a charakteristika	4
2.2. Metabolické poruchy asociované s metabolickým syndromem a jejich vztah ke kardiovaskulárním komplikacím	5
2.2.1. Inzulínová rezistence	6
2.2.2. Dyslipidémie	7
2.2.3. Obezita	7
2.2.4. Hypertenze	7
2.2.5. Hyperglykémie	8
2.3. Metabolický syndrom a oxidační stres	9
2.3.1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku a oxidační stres	9
2.3.2. Oxidační stres v rozvoji metabolického syndromu	9
2.3.2.1. Zdroje oxidačního stresu u metabolického syndromu	10
2.3.2.2. Mechanismus působení oxidačního stresu	13
2.3.2.3. Dyslipidémie a oxidační stres	16
2.3.2.4. Obezita a oxidační stres	16
2.3.2.5. Hypertenze a oxidační stres	17
2.3.2.6. Oxidační stres při hyperglykémii a diabetu	18
2.3.2.7. Jaterní steatóza jako nová komponenta metabolického syndromu	19
2.3.3. Oxidační stres a kardiovaskulární poruchy	20
2.4. Antioxidační ochranný systém	21
2.5. Možnosti nutriční a farmakologické intervence	25
3. CÍLE PRÁCE	29
4. METODICKÁ ČÁST	30
4.1. Experimentální modely	30
4.2. Podávané diety	32
4.3. Biochemické analýzy	34
4.3.1. Analýzy k posouzení oxidačního stresu	34
4.3.2. Analýzy lipidového a sacharidového metabolismu	36
4.3.3. Analýzy k posouzení inzulínové senzitivity a sekrece inzulínu	36
4.4. Extrakce tkání a příprava intracelulárních frakcí	38
4.5. Statistické metody	38
5. VÝSLEDKY	39
5.1. Oxidační stres u metabolických poruch spojených s metabolickým syndromem	39
5.1.1. Hypertriglyceridemií indukovaný oxidační stres	39
5.1.2. Změny parametrů oxidačního stresu v závislosti na věku	45
5.1.3. Vliv obezity na oxidační stres	47
5.1.3.1. Vliv nutričně vyvolané obezity	47
5.1.3.2. Vliv geneticky fixované obezity	48
5.1.4. Hypertenze a oxidační stres	51
5.1.4.1. Vliv juvenilní hypertenze na parametry oxidačního stresu	51

5.1.5. Hyperglykemií indukovaný oxidační stres	53
5.1.6. Úloha oxidačního stresu při nealkoholické jaterní steatóze	56
5.1.6.1. Oxidační stres v játrech u modelu metabolického syndromu s geneticky fixovanou hypertriglyceridemií	56
5.1.6.2. Vliv transgenní exprese SREBP-1a na oxidační stres	58
5.2. Ovlivnění oxidačního stresu nutriční a farmakologickou intervencí	62
5.2.1. Účinky konjugované kyseliny linolové	62
5.2.2. Antioxidační účinky vitamínu E	65
5.2.3. Metabolické účinky glutationu	68
5.2.3.1. Vliv podávání glutation etyl esterů	68
5.2.3.2. Vliv deplece glutationu	70
5.2.4. Metabolické účinky kyseliny lipoové	73
5.2.5. Vliv hypolipidemické terapie na oxidační stres a inzulinovou rezistenci	76
6. DISKUZE	80
7. ZÁVĚR	95
8. SOUHRN	98
9. LITERATURA	100
10. SEZNAM ZKRATEK	117
11. PŘÍLOHY	
publikace autora	119
identifikační záznam	121

1. ÚVOD

Problematicke inzulinové rezistence a metabolickému syndromu je v posledních letech věnována značná pozornost vzhledem k jejich podílu na rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a narůstající prevalenci diabetu 2. typu. Přes řadu nových poznatků o patogenezi metabolického syndromu, získaných díky rozvoji molekulárních metod, zůstává kauzalita jednotlivých poruch a patogeneze poruch glukózové homeostázy, makro- a mikrovaskulárních komplikací neobjasněna. V posledních letech přibývají poznatky o úloze oxidačního stresu a zánětu jako o společném mechanismu, který by mohl mít důležitou úlohu v rozvoji komplikací asociovaných s metabolickým syndromem. Pro tuto hypotézu svědčí zvýšené plazmatické koncentrace lipoperoxidačních produktů pozorované při zhoršené glukózové toleranci, u diabetiků 2. typu a u potkanů s extrémní, geneticky fixovanou obezitou.

Řada otázek týkajících se negativních účinků oxidačního stresu zůstává neobjasněna. Nejsou známy příčiny oxidačního stresu při inzulinové rezistenci a diabetu a není známo, zda k němu dochází v důsledku zvýšené tvorby volných radikálů nebo nedostatečného intracelulárního antioxidačního potenciálu, což má zásadní význam z hlediska možného terapeutického ovlivnění. Oxidační stres se odehrává ve tkáních, kde může indukovat poškození celulární integrity, a proto nelze z plazmatických hladin posoudit příčiny a důsledky oxidačního stresu na poruchy v jednotlivých orgánech. Proto je důležité analyzovat parametry oxidačního stresu v jednotlivých tkáních.

Neméně důležitá je i otázka do jaké míry lze oxidační stres nebo antioxidační systém ve tkáních ovlivnit vhodnou terapií. Velkým zklamáním v této souvislosti byly výsledky klinických studií, ve kterých vysoké dávky vitamínu E ani jeho kombinace s dalšími vitamíny s antioxidačními vlastnostmi nesnížily rizika rozvoje kardiovaskulárního onemocnění.

Z uvedeného vyplývá, že studium oxidačního stresu a hledání účinné nutriční a farmakologické terapie s použitím vhodných experimentálních modelů je z hlediska prevence nebo terapie poruch asociovaných s metabolickým syndromem velice žádoucí.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Metabolický syndrom – definice a charakteristika

Metabolický syndrom je charakterizován souborem metabolických poruch, které výrazně zvyšují riziko rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění (Reaven et al 1988). Kromě poruch glukózové homeostázy a diabetu 2. typu zahrnuje metabolický syndrom také další rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, jako je hyperinzulinémie, dyslipidémie, hypertenze, viscerální obezita, endoteliální dysfunkce a je provázen aktivací prozánětlivých a protrombotických faktorů.

Mimořádně vysoký výskyt metabolického syndromu a jeho významný dopad na kardiovaskulární morbiditu a mortalitu vyvolal značný ohlas u veřejných zdravotnických organizací, včetně Světové zdravotnické organizace (WHO) (Alberti et al 1998). Podle diagnostických kritérií, která byla stanovena WHO a dalšími organizacemi (Tabulka 1) bylo zjištěno, že u 15 až 25% obyvatelstva ve vyspělých zemích jsou přítomny alespoň tři metabolické abnormality uvedené v tabulce 1, jejichž přítomnost charakterizuje metabolický syndrom. Výsledky mnoha studií ukazují, že prevalence metabolického syndromu alarmujícím způsobem narůstá spolu se zvýšeným výskytem obezity a diabetu 2. typu (Wild et al 2004). Metabolický syndrom formuloval v roce 1988 Reaven jako syndrom X nebo syndrom inzulinové rezistence a inzulinovou rezistenci v něm označil za základní symptom tohoto syndromu. V roce 1989 ho Kaplan označil jako „deadly quartet“ a upozornil na koincidenci kardiovaskulárních rizikových faktorů včetně inzulinové rezistence, hypertenze, hypertriglyceridémie a viscerální obezity. V roce 1993 Reaven revidoval definici syndromu X, kde primárním nálezem je inzulinová rezistence, asociovaná s hypertenzí, hypertriglyceridemií a hyperglykemií, a často doprovázená poruchami koagulace a fibrinolýzy a kardiovaskulárního systému (Reaven 1993, Reaven 2005). V roce 1998 WHO doporučila jednotnou definici tohoto syndromu a dala přednost názvu „metabolický syndrom“ před názvem „syndrom inzulinové rezistence“ (Groop 2000).

Závažnost metabolického syndromu souvisí s tím, že zvyšuje riziko rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění. Klinická pozorování ukázala, že lidé s metabolickým syndromem jsou vystaveni dvojnásobnému až trojnásobnému riziku úmrtí na kardiovaskulární choroby a pěti-až devítinásobnému riziku rozvoje diabetu 2. typu (Park et al 2003). V patogenezi diabetu 2. typu a kardiovaskulárních komplikací se může uplatňovat řada metabolických abnormalit provázející metabolický syndrom.

Součástí metabolického syndromu je však celá řada poruch, které nebyly zahrnuty v původní definici, jako například hyperurikémie, zvýšená koncentrace LDL cholesterolu, endoteliální dysfunkce, poruchy fibrinolýzy a hemokoagulace.

Mezi důležité faktory, které mohou ovlivnit metabolický syndrom, patří faktory životního stylu. Výrazný vliv má však rovněž genetická predispozice. Prevalence metabolického syndromu se odhaduje v běžné populaci až na 30% a je mírně zvýšena pro mužskou část. Přestože definice, diagnostická kritéria, etiologie a postavení metabolického syndromu jako samostatné klinické jednotky jsou stále předmětem diskusí, zůstávají inzulinová rezistence, hyperinzulinémie a hyperglykémie jeho nepochybnými projevy.

Rizikovitost inzulinové rezistence, hyperinzulinémie a hyperglykémie potvrzuje řada epidemiologických studií, které dokládají, že uvedené abnormality představují nezávislé rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění.

Tabulka 1 – Definice metabolického syndromu pro evropskou populaci doporučená Mezinárodní diabetickou společností (International Diabetes Federation) 2005 ([Ford 2005](#)).

Abdominální obezita	muži > 94cm, ženy > 80cm
Hladina triglyceridů	≥ 1,7 mmol/l
HDL-cholesterol	muži < 1,03 mmol/l, ženy < 1,29 mmol/l
Krevní tlak	≥ 130 / ≥ 85 mm Hg
Glykémie nalačno	> 5,6 mmol/l

2.2. Metabolické poruchy asociované s metabolickým syndromem a jejich vztah ke kardiovaskulárním komplikacím

Všechny symptomy provázející metabolický syndrom představují rizikové faktory pro kardiovaskulární onemocnění (obrázek 1).

Obrázek 1 – Poruchy asociované s inzulinovou rezistencí zvyšující riziko kardiovaskulárního onemocnění.

inzulinová rezistence	<ul style="list-style-type: none"> - poruchy glukózové tolerance ⇒ diabetes 2. typu → - obezita ⇒ ↑lipolýza v tukové tkáni ⇒ ↑sekrece VLDL → - dyslipidémie: hypertriglyceridémie, ↓HDL, ↑ malé LDL → - retence Na⁺, aktivace sympatiku, změny v transportu iontů ⇒ hypertenze ⇒ hypertrofie levé komory → - endoteliální dysfunkce ⇒ poruchy vazodilatace ⇒ orgánová ischemie → - ↑PAI-1, ↑fibrinogen ⇒ poruchy fibrinolýzy a hemokoagulace ⇒ komplikace aterosklerózy → 	kardiovaskulární onemocnění
------------------------------	--	------------------------------------

2.2.1. Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence, která je důsledkem poruchy účinku inzulínu na metabolismus glukózy ve tkáních, je základní metabolická odchylka metabolického syndromu, která stojí v pozadí všech dalších projevů metabolického syndromu. Inzulínová rezistence byla definována v roce 1970 jako stav buňky, při kterém je k vyvolání kvantitativně normální utilizace glukózy zapotřebí většího než normálního množství inzulínu ([Berson a Yalow 1970](#)).

Přestože v posledních letech rozvoj molekulární biologie přinesl řadu nových poznatků o patogenezi inzulínové rezistence, její mechanismy nejsou zcela objasněny. Dříve byla hlavní pozornost zaměřena na studium metabolismu glukózy v kosterních svalech, ve kterých je metabolizováno až 80% glukózy. V současné době je pozornost věnována úloze tukové tkáně, vzhledem k sekreci FFA, prozánětlivých cytokinů TNF α , IL-6 a CRP ([Gustafson et al 2007](#)), které mohou významně přispívat k rozvoji vaskulárních komplikací při metabolickém syndromu.

Epidemiologické studie ukázaly, že vaskulární komplikace často provázejí pacienty s inzulinovou rezistencí a to ještě před nástupem hyperglykémie. Inzulínová rezistence je dnes považována za nezávislý a silný kardiovaskulární rizikový faktor. Inzulin se u zdravých osob podílí na indukci vazodilatace, jeho účinek zprostředkovává produkci NO v endoteliálních

buňkách. Inzulínová rezistence snižuje schopnost inzulinu podílet se na regulaci aktivity eNOS (Stuhlinger et al 2002). Další důsledek inzulínové rezistence je zvýšení vaskulární proliferace, ale mechanismus není objasněn. Inzulínová rezistence je rovněž spojena s protrombotickými stavy, u osob s inzulínovou rezistencí byla nalezena zvýšená aktivita inhibitoru plazminového aktivátoru (PAI-1) (Bartnik et al 2007).

2.2.2. Dyslipidémie

Dyslipidémie u metabolického syndromu je charakterizována zvýšenými koncentracemi cirkulujících triglyceridů, malých denních LDL, redukcí HDL-cholesterolu a postprandiálním zvýšením FFA (Verges 2005). Na těchto změnách se podílí zvýšená jaterní produkce VLDL částic, snížený katabolismus VLDL i IDL a snížená hladina HDL-cholesterolu v důsledku zrychleného katabolismu HDL částic. Hladina LDL-cholesterolu je většinou v normě, ale LDL částice vykazují některé abnormality, ke kterým patří jejich menší velikost, delší doba setrvávání v cirkulaci, v důsledku jejich nižší afinity k receptorům, a vyšší náchylnost k oxidativní modifikaci. Tyto lipidové abnormality, zejména snížená afinita oxidativně modifikovaných LDL částic k receptorům, a jejich akcelerovaný průnik do arteriální stěny spolu se zvýšenou glykací apolipoproteinů hrají důležitou roli v rozvoji aterogeneze (Haidara et al 2006). Zvýšené koncentrace FFA mohou přímo inhibovat aktivitu eNOS v endoteliálních buňkách a mohou též poškodit fibrinolýzu zvýšením hladin PAI-1.

2.2.3. Obezita

Většina pacientů s metabolickým syndromem je obézních, ale výskyt metabolického syndromu byl často pozorován i u osob, které nejsou obézní. Prevalence metabolického syndromu se s nárůstem obezity výrazně zvyšuje. Osoby neobézní představují asi 5%, osoby s nadváhou 22% a obézní osoby 60% pacientů s metabolickým syndromem (Roberts a Shindhu 2009). Obezita je rovněž spojena s vyšší prevalencí rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních komplikací.

2.2.4. Hypertenze

Hypertenze je diagnostikována u 30 – 60% diabetiků a její vyšší prevalence byla zjištěna i u pacientů s metabolickým syndromem (Ceriello 2008). Kauzální vztah mezi inzulínovou rezistencí a hypertenzí však zatím nebyl jednoznačně potvrzen. Byla ale navržena hypotéza, podle které je oxidační stres klíčový mechanismus uplatňující se v patogenezi inzulínové rezistence a hypertenze (Ceriello a Motz 2004). Podle současných představ se na rozvoji

hypertenze při diabetu pravděpodobně podílí snížená syntéza a dostupnost NO. Diabetes ve spojení s hypertenzí zvyšuje riziko trombotických komplikací (Haidara et al 2006).

2.2.5. Hyperglykémie

Hyperglykémie je typickou součástí metabolického syndromu a je také jedním z nezávislých diagnostických kritérií metabolického syndromu. Zahrnuje jak mírné poruchy glukózové homeostázy (hraniční glykémie nalačno a porucha tolerance glukózy) až po vysoké koncentrace glykémie při manifestaci diabetu (Tabulka 2). Pro rizikovost hyperglykémie, která se projevuje již na úrovni mírných poruch glukózové homeostázy, svědčí celá řada epidemiologických sledování (Grundy et al 2005). Kardiovaskulární riziko i riziko mikrovaskulárních komplikací v retině, ledvinách a periferním nervovém systému se extrémně zvyšuje se stoupajícími hladinami glykémie a s přítomností dalších poruch, ke kterým patří hypertenze, inzulinová rezistence, dyslipidémie a obezita (Jay et al 2006).

Všechny tyto poruchy společně zvyšují rozvoj endoteliálních dysfunkcí a předčasné aterosklerózy, zvyšují tendenci k trombotickým stavům a srdečním dysfunkcím. Molekulární mechanismus, kterým tyto faktory společně ovlivňují endoteliální buňky, buňky hladkého svalstva a kardiomyocyty, je komplexní a může být ovlivněn buněčnou transdukcí (Haidara et al 2006).

Relativní riziko kardiovaskulární mortality je 1,33 pro glykémii nalačno 6,1 vs 4,2 mmol/l a 1,58 pro postprandiální glykémii za 2 hodiny 7,8 vs 6,1 mmol/l. Postprandiální glykémie se tedy jeví jako důležitější faktor kardiovaskulární morbidity a mortality než glykémie nalačno (Bartnik et al 2007). Hyperglykémie může indukovat kardiovaskulární poškození ještě před nástupem diabetu. Ve studii DIGAMI bylo prokázáno, že zvýšením glykémie o 3 mmol/l se celková mortalita diabetiků zvýšila o 20% (Malmberg et al 2005).

Tabulka 2 – Klasifikace poruch glukózového metabolismu dle WHO (Bartnik et al 2007).

	Glykémie nalačno	Postprandiální glykémie za 2 hodiny
Normoglykémie	< 6,1 mmol/l	< 7,8 mmol/l
Zhoršená glukózová tolerance	6,1 – 7,0	7,8 – 11,1
Diabetes	> 7,0	> 11,1

2.3. Metabolický syndrom a oxidační stres

Recentní klinické i experimentální studie naznačily, že oxidační stres by rovněž mohl být společným patogenetickým mechanismem provázejícím metabolický syndrom a jeho vaskulární komplikace ([Evans et al 2003](#), [Ceriello a Motz 2004](#), [Hopps et al 2009](#)).

2.3.1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku a oxidační stres

Pro oxidační stres je charakteristická nerovnováha mezi tvorbou volných radikálů a antioxidačním ochranným systémem. Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) jsou vysoce reaktivní oxidační metabolity, které mají velmi krátkou dobu existence. Jsou produkovány ve všech biologických systémech, kde plní řadu velmi důležitých funkcí. ROS jsou nezbytnou součástí řady biochemických procesů včetně intracelulární signalizace, buněčné diferenciaci, přenosu energie, apoptózy, jsou důležitými nástroji imunitních reakcí a obrany proti mikroorganizmům ([Tohyama a Yamamura 2004](#)). Za fyziologických podmínek je tvorba ROS / RNS a antioxidační systém v rovnováze. Porušení této rovnováhy vede k oxidačnímu stresu, který se projevuje jako důsledek zvýšené produkce ROS, snížené aktivity antioxidačního systému nebo obojím dohromady. Při oxidačním stresu ROS, jako vysoce reaktivní látky, poškozují buněčné makromolekuly, vedou k metabolickým dysregulacím, mění buněčnou signalizaci, poškozují buněčné funkce. Všechny tyto změny se mohou uplatnit v patogenezi různých onemocnění, včetně aterosklerózy, zánětlivých reakcí, rozvoji inzulínové rezistence, poškození β -buněk pankreatu. Pro svou krátkou dobu existence jsou ROS jen obtížně stanovitelné, proto se dává přednost stanovení látek, které vznikají působením ROS jako jsou hydroperoxy, F₂-izoprostany, oxidované LDL, 4-hydroxynonenal, oxidované karbonyly nebo oxidované báze DNA ([Roberts a Shindhu 2009](#)).

2.3.2. Oxidační stres v rozvoji metabolického syndromu

Podle některých autorů ([Ceriello a Mortz 2004](#), [Brownlee 2001](#)) je oxidační stres společným patogenetickým mechanismem spojujícím inzulínovou resistenci s dysfunkcí β -buněk a dysfunkcí endotelu, které mohou vést až k rozvoji diabetu a kardiovaskulárnímu poškození. Oxidační stres poškozují β -buňky pankreatu, které mají velmi malou antioxidační ochranu a jsou proto velmi citlivé na působení ROS. Oxidační stres se může podílet na rozvoji inzulínové rezistence, uplatňuje se i v poškození inzulínové signální kaskády. Oxidační stres se objevuje ještě před nástupem diabetu, doprovází stavy inzulínové rezistence i zhoršené glukózové tolerance. Uplatňuje se v počátečních fázích vzniku a rozvoje diabetu a inzulínové

rezistence. Oxidační stres je však také podle současných představ klíčový mechanismus rozvoje chronických komplikací diabetu, je klíčovým patogenetickým činitelem v rozvoji cévní patologie při diabetu ([Škrha et al 2005](#)). Oxidační stres podmiňuje vznik endotelových dysfunkcí jako prvních známek změn v cévní stěně ([Pinkney et al 1997](#)), na které pak navazují morfologické odchylky. Přesný mechanismus, kterým oxidační stres působí na vznik a rozvoj diabetických komplikací, není znám. ROS zřejmě aktivují některé metabolické dráhy, jako syntézu glykovaných proteinů, tvorbu hexosaminů, přeměnu na sorbitol, které vedou ke zvýšené aktivitě některých proteinkináz a transkripčních faktorů PKC, MAPK či NFκB.

K oxidačnímu stresu nevedou jen dlouhodobě zvýšené koncentrace glukózy při diabetu, ale také dyslipidémie, která doprovází metabolický syndrom. Dyslipidémie společně s hyperglykemií působí synergicky na oxidační stres, jehož produkty se přímo zapojují do procesu aterogeneze. Proto mají cévní změny u diabetiků větší rozsah než u nediabetiků.

2.3.2.1. Zdroje oxidačního stresu u metabolického syndromu:

Na zvýšené produkci ROS a RNS při metabolickém syndromu se podílí celá řada metabolických poruch. Příčiny vzniku ROS a RNS stále nejsou plně vysvětleny, ale podílejí se na nich nejméně tyto metabolické poruchy: hyperglykémie, hyperinzulinémie, hypertriglyceridémie, obezita a hypertenze (Obrázek 2). Hyperglykémie (nalačno i postprandiální) ([Ceriello 2005](#)) indukuje oxidační stres několika mechanismy, uplatňuje se při tom autooxidace glukózy, formování pozdních produktů glykace (AGEs), aktivace polyolové a hexosaminové dráhy. Významnou úlohu hraje i zvýšená aktivace PKC a transkripčního faktoru NFκB. Zvýšená hladina ROS není iniciována jen zvýšenou hladinou glukózy ale dalšími látkami, které jsou při metabolickém syndromu zvýšeny jako jsou volné mastné kyseliny (FFA) a leptin.

Autooxidace glukózy – zvýšený metabolismus glukózy vede ke zvýšené produkci NAD a FAD, které jsou využívány v dýchacím řetězci mitochondrií k syntéze ATP. ([Bonnetfont-Rousselot 2002](#)) Ve zvýšeném protonovém gradientu mitochondrií je produkován superoxid ([Ceriello a Motz 2004](#)). Mitochondriální nadprodukce superoxidu zvyšuje syntézu diacylglycerolů (DAG), které následně aktivují protein kinázu C (PKC) ([Bonnetfont-Rousselot 2002](#)). Podle některých autorů hyperglykémie může přímo stimulovat de novo syntézu DAG, nezávisle na mitochondriálním metabolismu ([Inoguchi et al 2000](#)).

Produkty pokročilé glykace – AGE byly nalezeny v aterosklerotických lezích u diabetických pacientů (Nakamura et al 1993). Pravděpodobně přispívají k rozvoji aterosklerózy modifikací cirkulujících lipoproteinů a vazbou a aktivací receptorů pro AGE (RAGE) (Basta et al 2004). Stimulace RAGE vede ke zvýšené produkci ROS přes NADPH-oxidázu (Wautier et al 2001) a následnou aktivaci redox-senzitivních transkripčních faktorů a expresi zánětlivých mediátorů (Schmidt et al 1995, Chu et al 2001).

Polyolová cesta – (zvýšená aktivita polyolů, způsobující hromadění sorbitolu a fruktózy). Dva enzymy této cesty přispívají ke zvýšené produkci ROS : aldoso-reduktáza a sorbitol dehydrogenáza. Aldosoreduktáza používá NADPH pro redukci glukózy na sorbitol. Za normálních podmínek je produkce sorbitolu aldoso-reduktázou minoritní reakcí, ovšem za stavu hyperglykémie je 30-35% glukózy metabolizováno touto cestou (Ramana et al 2003). Snižuje se tím dostupnost NADPH, která následně snižuje regeneraci glutationu a aktivitu NOS, takže dochází ke zvýšení oxidačního stresu (Bonnetfont-Rousselot 2002).

Druhý enzym je sorbitol dehydrogenáza, která oxidauje sorbitol na fruktózu se současnou produkcí NADH. Zvýšené množství NADH může být využito NADH-oxidázou k produkci superoxidu nebo může přispívat k mitochondriální produkci superoxidu.

Hexosaminová cesta – zvýšená aktivita metabolické dráhy hexosaminů za stavu hyperglykémie vede k modifikaci transkripčních faktorů a tím ke změně genové exprese (Brownlee 2005). Za fyziologického stavu se jedná o minoritní dráhu metabolismu glukózy, která tvoří jen 2-3%. Zvýšená exprese inhibitoru plazminového aktivátoru 1 (PAI-1) a růstového faktoru $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) přispívají k rozvoji zánětlivé reakce a mikrovaskulárních komplikací. Hladina hexosaminů u osob s inzulínovou rezistencí dobře koreluje s cirkulujícími FFA a leptinem (Pouwels et al 2004).

↑ **FFA** – V poslední době přibývají důkazy o uplatnění FFA v oxidačním stresu (Steinberg a Baron 2002). Zvýšená koncentrace FFA v cytoplazmě vede ke zvýšené aktivitě acetyl-CoA oxidázy v peroxisomech a cytochromů v endoplazmatickém retikulu, tyto enzymy jsou dalším zdrojem ROS. Infuze FFA u lidí vedly ke zvýšeným hladinám izoprostanů (Stojiljkovic et al 2002), které jsou parametry lipoperoxidace.

↑ **Leptin** - Leptin je adipocytární hormon, který působí na centrální nervový systém, aby snížil příjem potravy. Působí také na endoteliální buňky, buňky hladkého svalstva, monocyty a makrofágy.(Peelman et al 2004) Plazmatické hladiny jsou u diabetiků 2.typu zvýšeny (Chan et al 2004, Wautier et al 2003) a toto zvýšení bylo spojeno s kardiovaskulárním onemocněním (Reilly et al 2004). Endoteliální buňky inkubované s leptinem produkovaly vyšší množství ROS (Yamagishi et al 2001, Boulomieu et al 1999), ale mechanismus není znám.

Zvýšená aktivita PKC Aktivace PKC hraje důležitou roli v diabetických vaskulárních komplikacích a má vztah k polyolové cestě. Zvýšená aktivita PKC v arteriální stěně (preferenčně je aktivována β -izoforma, ale zvýšeny mohou být i další izoformy α , δ , ϵ) je spojena s endoteliálními dysfunkcemi a inzulínovou rezistencí a může být indukovaná hyperglykemií, zvýšenou koncentrací FFA (pravděpodobně de novo syntézou DAG z glukózy a FFA) a s tím spojeným oxidačním stresem (Naruse et al 2006). Koncentrace DAG i aktivita PKC byly zvýšeny v aortách u Zucker fatty potkanů (Bohlen 2004). Zvýšená aktivita PKC β způsobuje inhibici Akt-dependentní eNOS regulaci. Zatím nebyly provedené studie, které by ukázaly, že zvýšená aktivita PKC vede až k manifestaci aterosklerózy a nejen k endoteliálním dysfunkcím. Podávání selektivního inhibitoru PKC β ruboxistaurinu (LY333531) zlepšilo vasodilataci u Zucker fatty potkanů (Bohlen 2004). Zvýšená aktivita PKC vede k oxidačnímu stresu a zároveň oxidační stres stimuluje redox senzitivní proteinkinázy PKC a MAPK.

mitochondriální dysfunkce Zvýšená produkce superoxidu v dýchacím řetězci je podle současných představ společným spouštěcím mechanismem nežádoucích metabolických poruch provázejících metabolický syndrom (Brownlee 2001, Green et al 2004). K mitochondriálním dysfunkcím vede zvýšený metabolismus mastných kyselin i hyperglykémie (Brownlee 2005). Dysfunkce mitochondrií se objeví ještě před nástupem zhoršené glukózové tolerance (Petersen et al 2004). Hlavní faktor ovlivňující mitochondriální produkci ROS je redox stav dýchacího řetězce. Hyperglykémie i vyšší nabídka mastných kyselin zvyšují elektronové donory (NADH a FADH₂), tím se zvýší tok elektronů dýchacím řetězcem a následně i poměr ATP/ADP, který vede k hyperpolarizaci membrány. Tento rozdíl potenciálu inhibuje elektronový transport v komplexu III a vede k akumulaci elektronů na koenzymu Q. Následně pak dochází jen k částečné redukci O₂ a vzniká superoxid (Rolo a Palmeira 2006).

Řada enzymů a enzymatických systémů může také být zdrojem zvýšené produkce ROS (cyklooxygenáza, lipooxygenáza, NO-syntáza, xantinoxidáza, myeloperoxidáza), ale hlavním zdrojem oxidačního stresu v arteriální stěně je NADPH oxidáza. Jedna z izoform PKC τ (théta) má unikátní schopnost aktivovat právě NADPH oxidázu a tím zvyšovat oxidační stres. Předmětem zájmu jsou nejen zdroje oxidačního stresu, které provázejí jednotlivé metabolické odchylky, ale především mechanismus působení oxidačního stresu, který vede k manifestaci komplikací, hlavně aterosklerózy a nástupu diabetu 2. typu.

Obrázek 2 – Metabolické poruchy jako zdroje ROS a RNS při metabolickém syndromu a jejich potenciální mechanismus.

HYPERGLYKÉMIE - autooxidace glukosy a AGE
neenzymová glykace proteinů
polyolová cesta (indukce metabolismu polyolových sloučenin)
hexosaminová cesta (zvýšená aktivita metab. dráhy hexosaminů)

HYPERINZULINÉMIE - aktivace NADPH-oxidázy (prostřednictvím aktivace PI3 kinázy)

HYPERTRIGLYCERIDÉMIE - ↑ konc.NEMK, lipoperoxidace
↑ signálních molekul pro aktivaci PKC

OBEZITA - ↑ produkce NEMK
↑ produkce dalších metab. aktivních látek - $\text{TNF}\alpha$

HYPERTENZE - vliv angiotensinu na NADH / NADPH systém
snížená dostupnost NO (tvorba peroxynitritů a uncoupled eNOS)

2.3.2.2. Mechanismus působení oxidačního stresu:

Zvýšená produkce ROS při metabolickém syndromu má řadu negativních důsledků :

souhrnný obrázek 3 ukazuje, jak se zvýšené hladiny glukózy (glukotoxicita) a volných mastných kyselin (lipotoxicita) mohou uplatnit při rozvoji inzulínové resistance a kardiovaskulárním poškozením. Zvýšená hladina ROS vede k lipoperoxidaci, tvorbě cytotoxických aldehydů a mitochondriálnímu poškození ([Schrauwen a Hesselink 2004](#)). Zvláště citlivé k účinkům ROS jsou polynenasycené mastné kyseliny. ROS a toxické aldehydy indukují oxidační stres tím, že způsobují depleci ATP, NAD, poškozují proteiny, lipidy, DNA a vedou k depleci glutationu.

Zvýšená tvorba ROS nejen přímo poškozují makromolekuly (DNA, proteiny, lipidy), ale nepřímo aktivuje kaskádu intracelulárních signalizačních drah ([Evans et al 2003](#)). Touto cestou je aktivována celá řada látek a ROS se tak mohou uplatnit jako intracelulární posilové signalizačních kaskád. Oxidační stres může aktivovat transkripční faktory AP-1 (řídí expresi genů regulující proliferaci, diferenciaci a apoptózu) a NF- κ B (aktivuje geny kódující syntézu cytokinů – $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8, růstových faktorů a adhezních molekul).

Oxidační stres způsobený zvýšenou akumulací lipidů v tkáních stimuluje řadu prozánětlivých látek, vede k lipoperoxidaci a tvorbě toxických aldehydů a může vést až k apoptóze buněk.

Zvýšená tvorba ROS může také vést k poškození inzulinové signalizační kaskády, ale především má řadu proaterogenních důsledků (Griendling 2003, Rizzoni et al 2001). Vede k oxidaci LDL, zvyšuje expresi adhezivních molekul, endoteliální dysfunkci a proliferaci a migraci buněk hladkého svalstva (Mehta et al 2006). Zvýšená koncentrace lipidů vede k tvorbě reaktivních oxidačních produktů lipoperoxidů, které se přímo podílejí na procesu aterogeneze. Lipoperoxidy i glykací pozměněné lipoproteiny jsou vychytávány scavengerovými receptory na makrofázích, které prostupují do subendoteliálního prostoru a ukládají se jako pěnové buňky v cévní stěně. Lipoperoxidační produkty jsou nejen zdrojem pro tvorbu aterogenních plátů, ale i aktivátory cytokínů, a tím i spouštěčem řetězce zánětlivých změn v cévní stěně (Haidara et al 2006).

Aterogenní působení oxidačního stresu

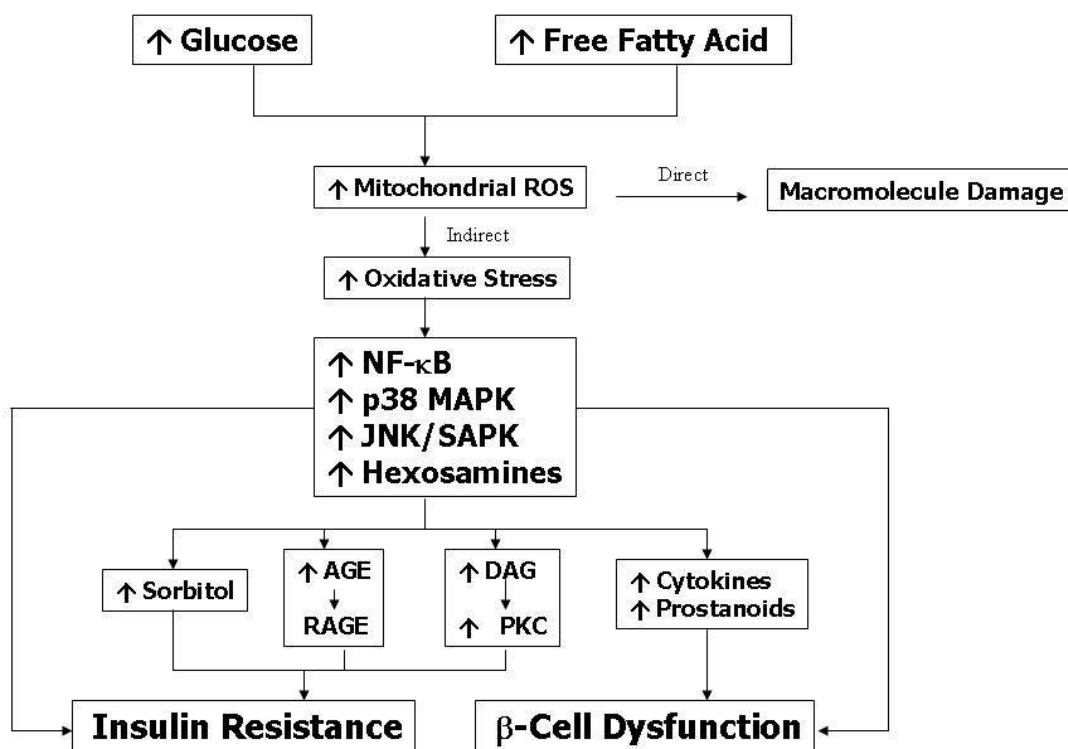
- oxidace a glykace LDL – oxidační modifikace LDL hraje klíčovou roli v procesu aterogeneze, vstup a zadržení lipoproteinů se považuje za hlavní krok aterogeneze (Ross 2004). Glykované LDL částice u diabetiků způsobují jejich větší náchylnost k oxidaci (Knott et al 2003).
- aktivace monocytů a makrofágů – přispívá k tvorbě aterosklerotických plátů. Monocyty se v arteriální stěně přeměňují v makrofágy, vychytávají modifikované lipoproteiny a přeměňují se v pěnové buňky, které sekretují zánětlivé mediátory a produkují ROS (Ross 2004).
- endoteliální dysfunkce – změna funkcí endoteliálních buněk hraje velmi důležitou roli v procesu aterogeneze a patří mezi první ukazatele vaskulárního poškození. Mezi endoteliální dysfunkce patří především ztráta vazodilatace endoteliálních buněk, zvýšená exprese adhezivních molekul VCAM a ICAM, zvýšená propustnost a zadržování cirkulujících lipoproteinů.
- buňky hladkého svalstva – Proliferace a migrace buněk hladkého svalstva hraje důležitou roli v procesu aterogeneze.

Endoteliální buňky jsou více citlivé k poškození ROS než buňky hladkého svalstva.

Oxidační stres může vést k poškození buněčných organel a membrán, může negativně ovlivnit funkci řady enzymů, tvorbu ATP a expresi genů regulujících v buňkách produkci cytokínů, inzulinovou signální kaskádu, proliferaci, diferenciaci a apoptozu. Tyto nálezy pak vedly k vyslovení hypotézy, podle které by mohl být oxidační stres společným mechanismem

buněčného poškození, které se může projevit zhoršením inzulínové rezistence periferních tkání, poruchami sekrece inzulínu a v rozvoji kardiovaskulárních poruch.

Obrázek 3 – aktivace redox-senzitivní kaskády (Evans et al 2003) (Nishikawa et al 2000).



J.L.Evans et al – Diabetes 52 : 1-8, 2003

Navrhovaná teorie, jak se zvýšené hladiny FFA a glukózy uplatňují v patofyziologii diabetu prostřednictvím produkce ROS. Schéma ukazuje spojení mezi hyperglykemií, zvýšenou hladinou FFA, mitochondriální produkcí ROS, oxidačním stresem, aktivací redox-senzitivní cesty (NFκB, MAPK a další), inzulínovou rezistencí, dysfunkcí β-buněk a diabetickými komplikacemi. Poslední in vitro studie ukazují, že přerušení mitochondriální produkce ROS blokuje oxidační stres indukovaný hyperglykemií a ovlivňuje aktivitu NFκB, PKC a produkci AGE, sorbitolu. ROS a RNS mohou také přímo poškodit makromolekuly a tím dále zvýšit oxidační stres. ROS ale také mohou působit jako signální molekuly a mohou aktivovat několik redox-senzitivních cest, které zahrnují aktivaci NFκB, MAPK, JNK/SAPK a zvýšenou produkci hexosaminů. Aktivace této cesty může vést přímo k inzulínové rezistenci, dysfunkci β-buněk nebo může aktivovat další redox-senzitivní cesty, které zahrnují aktivaci PKC, zvýšenou produkci AGE, sorbitolu, cytokinů a prostanoidů.

2.3.2.3. Dyslipidémie a oxidační stres

Lipidové abnormality u pacientů s metabolickým syndromem hrají důležitou roli v rozvoji atherogeneze i nealkoholické jaterní steatózy. Tyto lipidové abnormality mohou přispívat ke zvýšení oxidačního stresu a mohou přímo inhibovat aktivitu eNOS ([Haidara et al 2006](#)).

Ačkoliv hypolipidemika jako inhibitory HMG-CoA reduktázy (statiny), deriváty kyseliny fibrové (fibráty) jsou často používány při léčbě diabetických dyslipidemií, jejich vliv na vaskulární funkce není dobře znám ([Woodman et al 2005](#)).

Zvýšená koncentrace lipidů vede k tvorbě reaktivních oxidačních produktů lipoperoxidů, které se přímo podílejí na procesu atherogeneze. Lipoperoxidy i glykací pozměněné lipoproteiny jsou vychytávány scavengerovými receptory na makrofázích, které prostupují do subendoteliálního prostoru a ukládají se jako pěnové buňky v cévní stěně. Synergický účinek dyslipidémie a hyperglykémie vede k vystupňování oxidačního stresu. Jeho produkty (lipoperoxidy a glykoxidované lipidy) jsou nejen zdrojem pro tvorbu atherogenních plátů, ale i aktivátory cytokínů, a tím i spouštěčem řetězce zánětlivých změn v cévní stěně ([Hopps et al 2009](#)). Zvýšená utilizace mastných kyselin v myokardu při diabetu a snížená utilizace glukózy mohou vést k akumulaci toxických metabolitů mastných kyselin.

2.3.2.4. Obezita a oxidační stres

Obezita a snížená fyzická aktivita jsou častou příčinou rozvoje DM2 a jsou nezávislými rizikovými faktory inzulinové rezistence. Akumulace tuku v inzulin senzitivních tkáních může být příčinou inzulinové rezistence, přestože samotné uložené triglyceridy jsou inertní, jak vyplývá z experimentálních studií na transgenních zvířatech SREBP a A-ZIP/F ([Yki-Järvinen 2005](#)). Přesný mechanismus, jakým obezita přispívá k rozvoji inzulinové rezistence a kardiovaskulárního poškození, není znám. Pravděpodobně i v tomto mechanismu se uplatňuje oxidační stres. Pacienti s metabolickým syndromem po podání vysokoenergetické stravy měli postprandiálně zvýšeny lipoperoxidační produkty (TBARS) ([Devaraj et al 2008](#)). Podání lipidů (60g) vedlo u pacientů s metabolickým syndromem ke zvýšení hladiny oxidované formy glutathionu a snížení hladin redukované formy glutathionu a snížení aktivit antioxidačních enzymů glutathionperoxidázy, glutathionreduktázy a glutathiontransferázy ([Cardova et al 2008](#)). U pacientů s metabolickým syndromem byly rovněž zaznamenány snížené hladiny vitamínu E a C spolu se zvýšenými hladinami lipoperoxidačních produktů TBARS ([Palmiery et al 2006](#)). Hladiny TBARS dobře korelovaly s tloušťkou viscerální tukové tkáně, zatímco hladiny vitamínu C negativně korelovaly se stupněm hypertenze ([Palmiery et al 2006](#)).

Oxidační stres tukové tkáně je uvažován jako nový terapeutický cíl pro pacienty s metabolickým syndromem. Existuje silná vazba mezi viscerální tukovou tkání a oxidačním stresem, zvýšením močových F2-izoprostanů, dokonce i u neobézních lidí. Dalšími markery, které by mohly souviset s oxidačním stresem ve viscerální tukové tkáni jsou adiponektin a C-reaktivní protein (Fujita et al 2006). Oxidační stres viscerální tukové tkáně je včasný marker metabolického syndromu u experimentální modelů i u lidí.

2.3.2.5. Hypertenze a oxidační stres

Hlavním mechanismem, který se uplatňuje ve snížení vazodilatace, je nerovnováha mezi produkcí superoxidu a produkcí NO, který je důležitým vazodilatátorem (Ignarro 1999). Superoxidový anion se podílí na odstraňování NO a tím se stává důležitým determinantem biologické dostupnosti NO a může se tím podílet na modifikaci endoteliálních funkcí (Ceriello 2008). Důležitým zdrojem superoxidu v arteriální stěně je uncoupling eNOS, které při neúplné nebo nevhodné nabídce substrátů a kofaktorů, produkuje více superoxidu než NO (Landmesser et al 2003). Výsledkem se stává produkce vysoce nebezpečných peroxynitritů, které významně přispívají ke zvýšení oxidačního stresu v arteriální stěně. Významným podnětem zvýšení oxidačního stresu může být také angiotenzin II, který působí přes AT1 receptory (stimulují buněčný růst, angiogenezi a vazokonstrikci) a který stimuluje aktivitu nefagocytární NADPH-oxidázy a tím přispívá k akumulaci superoxidu v arteriální stěně (Touyz 2004). Další mechanismy, kterými mohou ROS způsobovat změny v cévní stěně, jsou přímé toxické působení na endoteliální buňky a buňky hladkého svalu a oxidační modifikace lipoproteinových částic (Chen et al 2001).

U pacientů s hypertenzí byly nalezeny zvýšené parametry lipoperoxidace spolu se sníženými aktivitami antioxidantních enzymů. Tyto parametry nebyly dále zhoršeny přítomností dalších komponent MS (Abdilla et al 2007). V rozvoji hypertenze jsou důležitými faktory oxidační stres a endoteliální dysfunkce. Pro uplatnění oxidačního stresu svědčí i studie s podáváním antioxidantů. V klinických studiích podávání některých antioxidantů, především vitamínu C zlepšilo endoteliální dysfunkce a alespoň dočasně snižovalo krevní tlak (Galley et al 1997). V experimentální studii na SHR potkaních podávání kyseliny askorbové snížilo krevní tlak a zvýšilo syntézu NO (Chen et al 2001).

2.3.2.6. Oxidační stres při hyperglykémii a diabetu

Hyperglykémie indukuje oxidační stres několika nezávislými mechanismy, které zahrnují autooxidaci glukózy, tvorbu pokročilých produktů glykace, abnormální metabolismus kyseliny arachidonové a jeho spojení s cyklooxygenázou, zvýšenou aktivaci PKC a NOS a aktivaci polyolové cesty (Grattagliano et al 2008). Těmito mechanismy chronická hyperglykémie poškozuje endotel a urychluje aterosogenezi (Haidara et al 2006, Evans et al 2003) (Obrázek 4). V klinických studiích byly u diabetiků pozorovány zvýšené koncentrace oxidačně poškozených proteinů a oxidačně modifikovaných lipoproteinů, zvýšené hladiny cirkulujících markerů oxidačního stresu a snížené hladiny antioxidantů. Zvýšené hladiny oxidačních produktů u DM2 korelují s hladinami glykemické kontroly (Ceriello a Motz 2004, Roberts a Shindhu 2009). Diabetici rovněž vykazovali zvýšenou náchylnost LDL částic k oxidaci (Rabini et al 1994), která korelovala se stupněm jejich glykosylace (Bowie et al 1993). Produkty AGE mohou reagovat s různými receptory na povrchu buněk, např. RAGE a tím mohou modulovat buněčné funkce prostřednictvím ligandů signální transdukce. Tímto mechanismem mohou spouštět produkci cytokínů a prozánětlivých adhezních molekul. Další důležitý cíl chronické hyperglykémie je nukleární enzym poly ADP ribosylpolymeráza. Tento enzym je aktivován při oxidačním nebo jiném poškození DNA a jeho funkcí je oprava DNA. Aktivace poly ADP ribosylpolymerázy odčerpává buněčné zásoby NADPH a nadměrná aktivace může vést k buněčným dysfunkcím a apoptóze (Soriano et al 2001). Hyperglykémie rovněž narušuje produkci NO a vede k endoteliálním dysfunkcím. Endoteliální NOS je NADPH dependentní enzym a za stavu hyperglykémie jako výsledek aktivace ADP ribosylpolymerázy může být potlačena aktivita eNOS a tím snížena vazodilatace. Hyperglykémie může poškozovat cévní stěnu také mechanismem zvýšené aktivace PKC, který je nezávislý na NO (Way et al 2001).

Další zdroj oxidačního stresu při diabetu představují zvýšené hladiny FFA (Obrázek 4), oxidace LDL a akumulace asymetrického dimethylargininu. Inzulínová rezistence je spojena se zvýšenými hladinami FFA a s akumulací triglyceridů v tukové tkáni a v dalších tkáních (Schrauwen a Hesselink 2004). Ektopicky uložené lipidy mají ve tkáních řadu negativních účinků, které jsou označovány jako lipotoxicita a projevují se zhoršenou utilizací glukózy, poruchami sekrece inzulínu a jaterní steatózou. Mastné kyseliny mohou poškodit buněčné orgány, včetně mitochondrií (Schrauwen a Hesselink 2004). Ektopické ukládání tuků do kosterního svalu předchází diabetu a objeví se již při rozvoji glukózové intolerance a inzulínové rezistence (Rasouli et al 2005). Viscerální tuková tkáň zvyšuje produkci prozánětlivých cytokínů, které mohou indukovat oxidační stres a přispívat k rozvoji

inzulínové rezistence (Evans et al 2003). Přesný mechanismus, jakým zvýšená hladina FFA a narušení lipidového metabolismu přispívá ke zvýšení oxidačního stresu, nejsou známy a věnuje se této problematice v poslední době zvýšená pozornost.

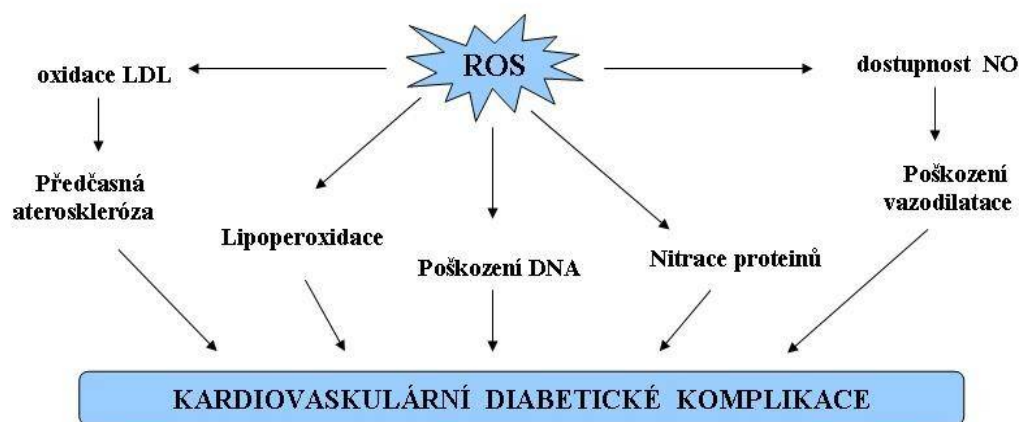
2.3.2.7. Jaterní steatóza jako nová komponenta metabolického syndromu

Nealkoholická jaterní steatóza (NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease) je nejčastějším chronickým poškozením jater, které doprovází metabolický syndrom. Toto poškození souvisí se zvýšenou akumulací lipidů v játrech, které negativně ovlivňuje metabolické poruchy spojené s inzulinovou rezistencí a může progredovat v nealkoholickou jaterní steatohepatitidu (NASH = non-alcoholic steatohepatitis) (Rector et al 2008). Patofyziologické mechanismy, které vedou k rozvoji nealkoholické jaterní steatózy nejsou přesně známy, ale podle současných poznatků se předpokládá dvoustupňový mechanismus rozvoje NASH. Prvním předpokladem v rozvoji NAFLD je akumulace lipidů v játrech spolu s rozvojem jaterní inzulinové rezistence. V dalším kroku se předpokládá, že se uplatňuje oxidační stres a produkce prozánětlivých cytokínů (Grattagliano et al 2008).

Oxidační stres může být důsledkem zvýšené oxidace mastných kyselin v mitochondriích, kdy produkce ROS může být ovlivněna depolarizací vnitřní membrány odpážením oxidativní fosforylace a dále částečným blokováním dýchacího řetězce. Vyšší produkce ROS může být i důsledkem oxidace mastných kyselin v peroxisomech nebo vyšší akumulací volného železa v játrech. Klíčová úloha je v souvislosti s oxidačním stresem při NAFLD připisována glutationu, který je v játrech syntetizován (Koruk et al 2004).

Biologické důsledky jaterní steatózy se objevují v dalších orgánech včetně arteriální stěny a myokardu, kde přispívají k rozvoji předčasné aterosklerózy. NAFLD je proto silným a nezávislým kardiovaskulárním rizikovým faktorem (Loria et al 2008).

Obrázek 4 – Schematické znázornění metabolických následků zvýšené produkce ROS a jejich možné uplatnění v procesu kardiovaskulárního poškození (Johansen et al 2005).



2.3.3. Oxidační stres a kardiovaskulární poruchy

Oxidační stres v cévní stěně hraje klíčovou roli v rozvoji kardiovaskulárních poruch při metabolickém syndromu (Chisolm et al 2000). ROS mohou přímo poškodit vaskulární buňky oxidační modifikací proteinů a DNA a také mohou nepřímo zvyšovat zánětlivé faktory a nevhodně aktivovat některé buněčné signální cesty zprostředkované PKC, MAPK a AGE (Schwartz a Reaven 2006, Muniyappa et al 1998). ROS mohou aktivovat PKC a tato aktivace dále zvyšuje oxidační stres aktivací NADPH-oxidázy (Inoguchi et al 2003), která je hlavním zdrojem superoxidu v arteriální stěně (Guzik et al 2002). Vzniklý superoxid poškozuje klíčové mediátory aterosklerózy jako jsou LDL lipoproteiny (oxLDL) nebo důležitý vazodilatátor NO (peroxynitrity) (Griendling et al 2000, Dusting et al 2005). Oxidační stres v arteriální stěně může snižovat dostupnost NO, která následně vede k endoteliálním dysfunkcím, ztrátě vazodilatace a proliferaci VSMC (Hsueh a Quinones 2003). Endoteliální NOSyntáza (eNOS) může být dalším důležitým zdrojem superoxidu v arteriální stěně, který produkuje tento enzym při nedostatku některého z kofaktorů. Navíc superoxid s NO může vytvářet vysoce nebezpečné peroxynitrity, které jsou příčinou endoteliálních dysfunkcí. Interakce NADPH oxidázy a eNOS tak může vést až k endoteliálním dysfunkcím (Alp a Channon 2004, Mehta et al 2006), které jsou považovány za první klinicky významný projev aterosklerózy. Zdrojem ROS v arteriálních endoteliálních buňkách a v buňkách hladkých svalů mohou být také mitochondriální dysfunkce rozpojením oxidativní fosforylace a xantin-oxidoreduktázový systém (Puddu et al 2005).

ROS jsou rovněž klíčovým aktivátorem zánětlivého intracelulárního transkripčního faktoru NFkB (Napoli et al 2001, de Winter et al 2005), který se uplatňuje při regulaci prozánětlivých a imunitních genů, apoptóze a buněčné proliferaci. Mnoho společných znaků obezity a inzulínové rezistence, jako zvýšené hladiny FFA, hyperglykémie, AGE, zánětlivé faktory, mohou přispívat k aktivaci tohoto transkripčního faktoru a tím potencovat rozvoj aterosklerózy (Suzuki et al 2001, Tripathy et al 2003).

ROS tak mohou přímo i nepřímo přispívat ke strukturálním a funkčním vaskulárním změnám a mohou mít řadu proaterogenních účinků. K nim patří zvýšená peroxidace lipidů a oxidativní modifikace lipoproteinových částic, které zvyšují akumulaci lipidů v subendoteliálním prostoru a tvorbu lézí (Jay et al 2006).

Za fyziologických podmínek jsou v myokardu využívány přednostně mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (60-70%), zbytek pokrývají sacharidy, glukóza (20%) a laktát (10%) (Coort et al 2006). Při inzulínové rezistenci dochází k chronické změně nabídky substrátů v myokardu, který metabolizuje v převážné míře lipidy (Carley a Severson 2005). Zvýšení FFA snižuje využití glukózy kaskádou zpětnovazebních inhibic enzymů glykolýzy (Randlův cyklus) a jejich oxidace spotřebovává větší množství kyslíku asi o 30%, aby produkovala stejné množství ATP jako oxidace glukózy (Ferrannini a Iozzo 2006, Pleiner et al 2002). Vysoké intracelulární koncentrace lipidů v myokardu mohou rovněž aktivovat NADPH oxidázový systém aktivací metabolické dráhy DAG-PKC a tím přispívat k prohloubení oxidačního stresu.

2.4. Antioxidační ochranný systém

Na zvýšení oxidačního stresu se nemusí podílet jen zvýšená produkce ROS a RNS ale také snížená antioxidační ochrana. Klíčovou roli v antioxidačním ochranném systému hraje antioxidační enzym superoxiddismutáza (SOD), která přeměňuje superoxid na peroxid vodíku. U lidí existují tři typy SOD: mitochondriální MnSOD, cytosolická Cu/Zn SOD a extracelulární SOD. Na reakci SOD navazuje enzymatická degradace peroxidů pomocí dalších antioxidačních enzymů katalázy (CAT) a selenodependentní glutathionperoxidázy (GPx), které přeměňují peroxid na vodu a molekulární kyslík. V přítomnosti redukovaných přechodných kovů může být peroxid vodíku transformován na vysoce reaktivní hydroxylový radikál (OH \cdot). Velmi účinný ve vylučování hydroxylového radikálu je membránově vázaný vitamín E, který tak chrání lipidy a membrány proti nežádoucí lipoperoxidaci. Vitamin E

(souhrné označení pro všechny tokoferoly a tokotrienoly) reakcí s volnými radikály sám přechází na tokoferylový radikál, který musí být regenerován některým z koantioxidantů (nejčastěji kyselina askorbová nebo glutation). Reakce se tím převádí z lipidového prostředí do vodného, neboť v lipidovém prostředí nastává cyklizace a propagace radikálové řetězové reakce a organismus jen obtížně ukončuje sled těchto reakcí.

Působením vitamínu E a volných radikálů vznikají organické hydroperoxy, které jsou dále odstraňovány prostřednictvím GPx. Tento antioxidační enzym se podílí nejen na přímém ostraňování ROS, ale i na odstraňování produktů, které vznikají působením volných radikálů. GPx využívá pro svou funkci jako kofaktoru redukovanou formu glutationu (GSH), kterou převádí na oxidovanou formu (GSSG). Ta se dostává zpět na redukovanou formu působením dalšího antioxidačního enzymu NADPH-dependentní glutathionreduktázy (GR). GPx a GR udržují obě formy glutationu v určitém poměru, který je za fyziologických podmínek 95:5 ve prospěch redukované formy. Poměry GSH/GSSG a vitamin E/ vitamin C jsou důležitými ukazateli oxidačního stresu. Vitamíny E a C a glutation patří mezi nejdůležitější neenzymatické antioxidanty. Glutathion kromě regeneračního působení na tokoferylový radikál a funkce kofaktoru antioxidačních enzymů GPx a GR, má i řadu dalších důležitých funkcí – převádí askorbát přes membránu a prostřednictvím glutathiontransferázy se podílí na odstraňování látek glutathionylací.

Antioxidační ochranný systém je systém, ve kterém jednotlivé antioxidanty navzájem spolupracují, kdy na funkci jednoho antioxidantu navazuje funkce druhého. Vzájemné vazby mezi antioxidanty enzymatickými i neenzymatickými uvádí obrázek 5. Každý článek tohoto systému má svou specifickou funkci a buněčnou lokalizaci. Nejen nedostatek některého z antioxidantů ale také porušení rovnováhy tohoto systému (např. podáváním vysokých dávek jednoho z antioxidantů) může vést k řadě patologických stavů.

Antioxidační systém zahrnuje mnoho látek, přesto některé z nich nejsou dobře prozkoumány. Pozornost se v poslední době zaměřila na úlohu γ -tokoferolu, který je hlavní dietní formou vitamínu E, ale jeho sérové koncentrace představují jen asi 10 – 15% celkového množství vitamínu E v séru. γ -Tokoferol má některé odlišné vlastnosti od α -tokoferolu, především je účinnější ve vylučování dusíkových radikálů, hlavně peroxynitritů.

V klinické studii byly u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním nalezeny snížené koncentrace γ -tokoferolu a nikoliv α -tokoferolu. ([Kontush et al 1999](#))

V poslední době přibýly důkazy, že látky, které byly dosud známy pro své antioxidační vlastnosti, mohou mít i jiné funkce označované jako neantioxidační. Tyto neantioxidační funkce byly pozorovány u α - a γ -tokoferolu ale také u glutationu. Tyto funkce jsou více specifické a jejich základ tvoří specifické interakce α - a γ -tokoferolu s enzymy a proteiny.

Především se jedná o modulaci buněčné signalizace a regulaci genové transkripce. Mnoho z pozorovaných neantioxidačních funkcí lze vysvětlit inhibičním působením α -tokoferolu na aktivitu PKC α izoformu (γ -tokoferol je mnohem méně účinný). Mechanismus působení je pravděpodobně defosforylací PKC proteinfosfatázou A2, která je aktivována α -tokoferolem. V možném antiaterosklerotickém působení α - i γ -tokoferolu hrají důležitou roli oba typy funkcí. Srovnání funkcí α - a γ -tokoferolu udává tabulka 3.

Zatímco většina experimentálních studií potvrdila pozitivní účinek vitamínu E především na oxidabilitu lipoproteinových částic, velké klinické studie nepotvrdily pozitivní účinek vitamínu E na kardiovaskulární poškození, dokonce při dávce >400 mg/den prokázaly zvýšenou úmrtnost na kardiovaskulární choroby (Lakka et al 2002). Tyto velké klinické studie sledovaly koncentrace pouze α -tokoferolu. Zatím nebylo uspokojivě vysvětleno, proč podávání antioxidantů nevedlo ke zlepšení kardiovaskulárního poškození, když je toto poškození spojeno se zvýšeným oxidačním stresem.

Tabulka 3 – Srovnání účinků α - a γ -tokoferolu. Všechny tyto funkce tvoří základ pro skutečnou biologickou aktivitu α - a γ -tokoferolu *in vivo*, která je pro α -tokoferol 1,49 IU a pro γ -tokoferol 0,15 IU. (Traber 2007)

ANTIOXIDAČNÍ FUNKCE	
α -tokoferol	γ -tokoferol
Účinný ve vychytávání hydroxylového radikálu	Má větší antioxidační aktivitu Účinnější proti dusíkovým radikálům
Ovlivňuje aktivity lipooxygenázy, NADPH-oxidázy, NO-syntázy	Ovlivňuje aktivitu SOD Lépe odráží skutečnou tkáňovou koncentraci
NEANTIOXIDAČNÍ FUNKCE	
α -tokoferol	γ -tokoferol
Má větší biologickou aktivitu	Ovlivňuje aktivitu cyklooxygenázy
Ovlivňuje aktivitu PKC α a s tím spojené biologické funkce	Má protizánětlivé a antikoagulační účinky

Tabulka 4 – přehled funkcí glutathionu (Wu et al 2004)

Antioxidační	Přímé vychytávání volných radikálů Odstraňuje H ₂ O ₂ a lipoperoxidy Podílí se na regeneraci vitamínu E a C Je kofaktorem glutathiondependentních antioxidačních enzymů
Metabolické	Syntéza leukotrienů a prostaglandínů Produkce laktátu z methylglyoxalu Formování glutathion-NO aduktů Zásoby a transport cysteinu Transport askorbátu přes buněčnou membránu
Regulační	Intracelulární redox stav Signální transdukce a genová exprese DNA syntéza a syntéza proteinů Buněčná proliferace a apoptóza Produkce cytokínů a imunitní odpověď Glutathionylace proteinů Funkce a integrita mitochondrií

Klinické studie přinesly důkazy o tom, že pacienti s metabolickým syndromem i diabetičtí pacienti mají nejen zvýšené markery oxidačního stresu, ale také snížené hladiny antioxidačního systému (Martin-Gallan et al 2003, Seghrouchni et al 2002, Ford et al 2003, Atli et al 2004), ale ne všechny studie to potvrdily (Sjogren et al 2005). V nedávno publikované studii z USA byly u souboru 2268 pacientů s metabolickým syndromem a 6540 kontrolních osob zjištěny výrazně nižší plazmatické koncentrace celého spektra antioxidantů (Ford et al 2003).

V experimentální studii u SHR potkanů byla nalezena snížená antioxidační kapacita a nedostatečná exprese u všech tří antioxidačních enzymů SOD, CAT, GPx (Zhan et al 2004). Overexprese SOD chránila myokard před poškozením ROS během ischemicko-reperfúzního poškození (Tanaka et al 2004). Stále se však málo studií zaměřuje na koncentrace těchto látek ve tkáních.

[illegible]

2.5. Možnosti nutriční a farmakologické intervence

Možnosti pozitivního účinku α -tokoferolu na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění naznačily výsledky velkých dlouhodobých observačních studií z let 1985-1995, ve kterých byla zjištěna negativní korelace mezi příjmem vitamínu E v dietě a rizikem ischemické

choroby srdeční (Miller et al 2004). Naproti tomu velkým zklamáním byly výsledky intervenčních studií, ve kterých podávání α -tokoferolu v dávkách 400-800 IU po dobu 18 měsíců až 7 let neovlivnilo v primární nebo sekundární prevenci riziko kardiovaskulárního onemocnění (Stephen et al 1996). Nedávno provedená studie v USA dokonce ukázala, že podávání vysokých dávek α -tokoferolu (1800 IU/den po dobu 1 roku) negativně ovlivnilo kardiovaskulární systém (Economides et al 2005).

Naproti tomu v experimentálních studiích α -tokoferol zvyšoval rezistenci lipoproteinových částic k oxidativní modifikaci, inhiboval produkci kyslíkových radikálů z aktivovaných makrofágů, stabilizoval buněčné membrány a inhiboval proliferaci buněk v arteriální stěně (Traber 2007).

Nejednoznačné výsledky přinesly také klinické studie, v nichž byl podáván vitamín E nemocným s diabetem 1. a 2. typu. V některých studiích podávání farmakologických dávek vitamínu E snižovalo tvorbu lipoperoxidačních produktů a zlepšilo senzitivitu tkání k účinku inzulínu (Paolisso et al 1994, Reaven et al 1995); avšak tyto příznivé účinky vitamínu E na inzulínovou senzitivitu nebyly prokázány v dalších studiích (Škrha et al 1999). Nevýhodou těchto klinických studií je, že neposkytly žádné informace o koncentracích α -tokoferolu v lipoproteinových částicích ani o antioxidačním systému ve tkáních. Je třeba zdůraznit, že plazma je pro tento antioxidant pouze transportním médiem, místem jeho skutečného působení jsou tkáně. Klinické studie rovněž nesledovaly hladiny γ -tokoferolu, který je hlavní dietní formou vitamínu E a který by mohl vysvětlit příčiny diskrepancí mezi epidemiologickými a intervenčními studiemi. V porovnání s velkým zájmem, který byl věnován v minulých letech vztahu α -tokoferolu ke kardiovaskulárnímu poškození, existuje jen velmi málo údajů o vlivu γ -tokoferolu. V menší klinické studii u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (n=69) autoři zjistili signifikantní snížení hladin γ -tokoferolu o 25% ($p<0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou, zatímco koncentrace α -tokoferolu nebyly rozdílné (Örvall et al 1996). Rovněž v další studii byly u pacientů s koronární aterosklerózou zjištěny snížené koncentrace γ -tokoferolu o 40% ($p<0,001$), zatímco koncentrace α -tokoferolu byly u těchto pacientů zvýšeny (Kontush et al 1999). Nižší plazmatické koncentrace γ -tokoferolu byly zjištěny i u pacientů s akutním infarktem myokardu (Ruiz Rejón et al 2002).

V některých studiích byly sledovány možnosti pozitivního působení antioxidantů při hypertenzi. Některé antioxidanty, především vitamin C a glutation, snižovaly krevní tlak u normotenzních i hypertenzních subjektů, s i bez diabetu (Ceriello et al 2000). Kombinace zinku, askorbátu, tokoferolu a β -karotenu v krátké době snižovala krevní tlak a autoři ji

doporučili jako vhodnou podpůrnou terapii hypertenze (Galley et al 1997). I zde však existuje diskrepance mezi intervenčními a observačními studiemi. Zatímco zvýšený dietní příjem antioxidantů vykazoval spíše příznivý vliv na hypertenzi a tím i obecně na kardiovaskulární riziko, podání lékových suplementací antioxidantů neměl příznivý efekt nebo dokonce vykazovala negativní vliv (Huang et al 2006).

Možné terapeutické ovlivnění poruch asociovaných s metabolickým syndromem a oxidačním stresem se zaměřilo také na kyselinu lipoovou, která hraje důležitou roli v energetickém metabolismu, ale má i další funkce. α -LA i její redukční forma kyselina dihydrolipoová (DHLA) jsou silné multifunkční antioxidanty (Bast a Haenen 2003). Působí přímo při vychytávání ROS, dále se podílí na regeneraci jiných antioxidantů (vitamíny E, C a glutation), chelataci iontů kovů a reparaci oxidovaných proteinů. Redukci LA na DHLA zajišťuje NADPH dependentní lipoamiddehydrogenáza, ale také glutathionreduktáza a thioredoxinreduktáza. Kyselina lipoová je v organismu syntetizována de novo v játrech i v ostatních tkáních a ve zvýšené míře se vyskytuje ve tkáních, které jsou metabolicky aktivní, jako jsou játra, myokard a ledviny. Terapeutické využití LA se zaměřilo na snížení kardiovaskulárního rizika pro svůj pozitivní vliv na oxidabilitu LDL, hladinu krevních lipidů a hypertenzi (Wollin a Jones 2003). Všechny studie však neprokázaly tento efekt. Další studie s podáváním LA sledovaly její vliv na zmírnění diabetických komplikací. Intenzivně byl zkoumán vliv LA na vznik a rozvoj diabetických polyneuropatií (Smith et al 2004).

Zájem o pozitivní ovlivnění metabolických poruch spojených s oxidačním stresem se zaměřil i na podávání dalších antioxidantů – glutationu a nověji SOD-mimetic a kataláza-mimetic (Ceriello 2006).

Funkční lipidy v prevenci metabolického syndromu

V prevenci metabolického syndromu jsou sledovány možné pozitivní účinky některých lipidů, především polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) pro své příznivé antiaterogenní a protizánětlivé účinky. Vedle sledování vlivu n-3 a n-6 PUFA jsou v popředí zájmu v poslední době konjugované mastné kyseliny. Na rozdíl od PUFA, kde jsou dvojné vazby v nekonjugovaném pentadienovém uspořádání, pro konjugované mastné kyseliny je typické množství prostorových a geometrických izomérů. Tyto mastné kyseliny jsou zkoumány pro své specifické účinky.

Pozornost se zaměřila především na sledování účinků konjugované kyseliny linolové (CLA), která je doporučována jako potravinový doplněk na snížení tělesné hmotnosti. Byly

pozorovány i další účinky této mastné kyseliny antiadipogenní (DeLany et al 1999), antiaterogenní (Kritchevsky et al 2004), protizánětlivé (Noto et al 2007) i příznivé účinky na inzulínovou rezistenci (Houseknecht et al 1998). Všechny studie nepotvrdily tyto účinky a výsledky klinických studií jsou značně rozporuplné a nekonzistentní (Riserius et al 2004).

Farmakologická intervence

Vedle statínů a thiazolidinedionů patří fibráty k často podávaným lékům pro léčbu hypertriglyceridémie u osob s metabolickým syndromem. Mechanismus jejich hypolipidemického účinku souvisí s tím, že fibráty jsou ligandami transkripčních faktorů PPAR α a regulují geny zapojené do syntézy a sekrece triglyceridů v játrech a oxidace mastných kyselin ve tkáních (Ferré 2004). Méně informací je známo o vlivu fibrátů na inzulínovou rezistenci a oxidační stres ve tkáních. V některých studiích byl zjištěn příznivý vliv fibrátů na inzulínovou rezistenci (Guerre-Millo et al 2000), zatímco jiné studie tento účinek nezjistily (Sane et al 1995). Nejednoznačné jsou i výsledky studií, ve kterých byl sledován vliv fibrátů na parametry oxidačního stresu. V experimentálních studiích byl pozorován jak antioxidační účinek fibrátů (Evans et al 2003), nebo žádné ovlivnění oxidačního stresu (Becuwe et al 1999), ale dokonce i prooxidační vliv (O'Brien et al 2001).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo získání poznatků o uplatnění oxidačního stresu v patogenezi poruch spojených s metabolickým syndromem. Pozornost byla zaměřena na mechanismy, které se podílejí na rozvoji oxidačního stresu a dalších metabolických poruch provázejících metabolický syndrom.

V práci byly sledovány následující otázky:

- ÚLOHA OXIDAČNÍHO STRESU V ROZVOJI METABOLICKÝCH PORUCH SPOJENÝCH S METABOLICKÝM SYNDROMEM

Byly sledovány parametry oxidačního stresu v séru, myokardu, aortě a v játrech a jejich možné uplatnění v patogenezi metabolických a kardiovaskulárních poruch provázejících metabolický syndrom. Sledovány byly jednotlivé metabolické poruchy, včetně nealkoholické jaterní steatózy jako nové komponenty metabolického syndromu.

- OVLIVNĚNÍ OXIDAČNÍHO STRESU NUTRIČNÍ A FARMAKOLOGICKOU INTERVENCÍ

Sledovány byly možnosti pozitivního ovlivnění oxidačního stresu nutriční a farmakologickou intervencí.

4. METODICKÁ ČÁST

4.1.Experimentální modely

K pokusům byly použity následující modely metabolických poruch:

- kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg)
- experimentální model nedostatečně kompenzovaného diabetu
- kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR)
- transgenní kmen SHR potkanů se zvýšenou expresí transkripčního faktoru SREBP
- obézní kmen Koletského potkanů

Kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů:

Začátkem 90. let byl na metabolickém pracovišti IKEM (Institut klinické a experimentální medicíny, Praha) z potkanů kmene Wistar vyselektován unikátní kmen neobézních hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg), který vykazuje prakticky všechny symptomy metabolického syndromu (hypertriglyceridémie, hyperinzulinémie, hypertenze, zhoršená glukózová tolerance) (Vrána a Kazdová 1990). Vedle zvýšení hladin triglyceridů je zvýšen také krevní tlak, NEMK, plazmatická hladina kyseliny močové. Nejsou zvýšeny plazmatické hladiny cholesterolu. Zvířata jsou výrazně inzulinorezistentní a mají poruchu glukózové tolerance. Chov je držen na Pracovišti experimentální medicíny IKEM, Praha.

Kmen spontánně hypertenzních potkanů: Spontánně hypertenzní potkan (SHR) byl vyselektován v Japonsku z outbrední kolonie potkanů kmene Wistar autory Okamoto a Aoki (1963) za účelem získání genetického modelu pro zkoumání humánní esenciální hypertenze. Kolonie, která je až dosud inbredně udržována na Fyziologickém ústavu AV ČR, byla před 20 lety přivezena do Prahy z firmy OLAC z Anglie - SHR/Ola. Tito potkani patří k nejrozšířenějším genetickým modelům humánní esenciální hypertenze. Vykazují abnormality glukózového a lipidového metabolismu (Furukawa et al 1998) a jsou-li potencionováni speciální dietou (např. vysochosacharózovou), stávají se vhodnými modely pro identifikaci QTL ovlivňujících hypertenzní metabolický syndrom na molekulární úrovni (Pravenec a Kurtz 2002). Hypertenze se u kmene SHR zhoršuje během stárnutí a je provázána četnými vaskulárními změnami (Bernard et al 1998). Pravenec et al. (1999) prokázali, že na chromozomu 4 u SHR potkanů jsou oblasti ovlivňující četné fenotypové abnormality metabolického syndromu, včetně krevního tlaku, dyslipidémie a glukózové tolerance. Pomocí

vazebných a transgenních komplementačních studií bylo zjištěno, že tyto QTL na chromozomu 4 jsou podmíněny deleční variantou Cd36 genu, který kóduje důležitý transportér mastných kyselin (Pravenec et al 2001).

Pro tento kmen je charakteristická geneticky fixována hypertenze. Podáváním diety s vysokým podílem fruktózy lze u těchto zvířat vyvolat metabolické poruchy provázené hypertriglyceridemií, hyperinzulinemií a poruchou glukózové tolerance.

Kmen Koletsky:

Pro tento kmen, který má geneticky fixovanou poruchu leptinového receptoru, je charakteristická excesivní akumulace tělesného tuku již v období po odstavu, která je spojena s dalšími abnormalitami - hypertenzí, hypertriglyceridemií a hyperinzulinemií a poruchou glukózové tolerance (Golda a Hilgertová 1998). Kontrolní skupiny tvořili štíhlí sourozenci.

Experimentální model nedostatečně kompenzovaného diabetu

Jako experimentální model nedostatečně kompenzovaného diabetu byli použiti potkani kmene Wistar, u kterých byl experimentálně vyvolaný diabetes intraperitoneálním podáním streptozotocínu v dávce 55 mg/kg t.hm. 4 týdny před ukončením pokusu. Podáním streptozotocínu dojde k destrukci β -buněk a k hyperglykémii.

Kontrolní zvířata – kmen potkanů Wistar z chovu firmy VELAZ, Praha

Transgenní zvířata

V poslední době se stále častěji využívá ke studiu patofyziologických mechanismů experimentálních modelů geneticky modifikovaných zvířat, které umožňují lépe objasnit úlohu poruchy spojené s příslušným genem. V této práci byli použiti transgenní spontánně hypertenzní potkani se zvýšenou expresí nukleárního transkripčního faktoru SREBP-1a. SREBP (sterol-regulatory element binding protein) jsou transkripční faktory, které aktivují expresi řady genů zapojených do syntézy cholesterolu, triglyceridů, mastných kyselin a fosfolipidů v játrech.

Neobézni transgenní experimentální model se zvýšenou expresí SREBP-1a transkripčního faktoru vykazuje většinu poruch metabolického syndromu – hypertenzi, jaterní steatózu. Zvýšená akumulace lipidů v játrech rovněž může přispět k rozvoji inzulinové rezistence a metabolického syndromu. Zvýšená exprese SREBP-1a byla vytvořena mikroinjekcím zygot SHR potkanů konstruktem složeným z lidského SREBP-1a pod kontrolou promotoru PEPCK. Zvýšená produkce tohoto transkripčního faktoru stimuluje v játrech expresi genů

zapojených do syntézy cholesterolu a triglyceridů a tím vede k jaterní steatóze a dalším projevům metabolického syndromu – hyperglykémii, hyperinsulinémií a hypertriglyceridémií (Qi et al 2005).

Transgenní SHR potkani se zvýšenou overexpresí lidského transkripčního faktoru SREBP-1a, reprezentuje neobézni model jaterní steatózy, porušeným glukózovým i lipidovým metabolismem a hypertenzí. Poskytuje nové možnosti ve studiu patogeneze a léčby jaterní steatózy, která je v řadě případů součástí poruch při metabolickém syndromu.

Zvířata byla chována v chovných klecích v místnosti se standardními podmínkami při konstantní teplotě a sledované vlhkosti vzduchu, měla volný přístup k pitné vodě a byla krmena *ad libitum* standardní peletovou dietou, popř. dietou s vysokým podílem sacharózy nebo fruktózy. Ve všech pokusech se jednalo o samce a všechna zvířata byla před dekapitací v sytém stavu. Experimenty probíhaly v souladu s předpisy etické komise a se zákonem ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

4.2. Podávané diety

Nutričně podmíněná inzulinová rezistence – vysokosacharózová dieta, vysokotuková dieta, fruktózová dieta

U laboratorních zvířat je možné nutričně vyvolat inzulinovou rezistenci buď zvýšením energetického příjmu nebo změnou ve složení základních živin v potravě. Příkladem může být vysokosacharózová resp. vysokofruktózová dieta (Shafrir 1998; Vrána et al 1993) nebo dieta s vysokým podílem tuků (Storlien et al 1991). Podávání těchto diet vede ke zvýšení plazmatických koncentrací triglyceridů a NEMK a dále zhoršují senzitivitu tkání k účinku inzulinu. U modelů s nutričně indukovanou inzulinovou rezistencí je výhodou snadná dostupnost. Nevýhodou je, že u nich není metabolický syndrom rozvinut v plné šíři, ale vykazuje jen některé z jeho složek. Další komplikací je skutečnost, že projevy inzulinové rezistence se u modelů mění v závislosti na délce podávání diety (Chicco et al 1994) a navíc po vysazení stimulu dochází k navracení hodnot do fyziologické normy (Chicco et al 1999).

Tabulka 5: Standardní dieta (Fábry 1961).

Složení	hmotnostní %
kasein	8
sušené mléko	10
vojtěška	4,0
vitamínová a minerální směs	3,5
tuk	1
sušené droždí	4
šrot	2,5
škrob, pšenice	66
agar	1

Tabulka 6: Vysokosacharózová dieta (Fábry 1961).

Složení	hmotnostní %
kasein	12,5
sušené mléko	9,0
vojtěška	3,0
vitamínová a minerální směs	3,5
sacharóza	63,0
agar	9,0

Tabulka 7: Vysokofruktózová dieta

K4102.0, fa Hope Farms, the Netherlands	
Složení	hmotnostní %
fruktóza	69,3
celulóza	5,0
sojový olej	5,0
kasein	15,0
cholin	0,4
methionin	0,2
MgO	0,2
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,4
sůl	0,3
KCl	0,7
KH ₂ PO ₄	0,7
CaCO ₃	1,0
CaHPO ₄ .2 H ₂ O	1,3
směs vitaminů	0,25
směs stopových prvků	0,25

4.3. Biochemické analýzy

4.3.1. Analýzy k posouzení oxidačního stresu

Produkty oxidačního stresu – CD, TBARS

Jako indikátory lipoperoxidace byly v plazmě i tkáních sledovány hladiny konjugovaných dienu, které vznikají v iniciálních fázích lipoperoxidace, a látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS), které jsou terminálními produkty lipoperoxidace. Konjugované dieny byly extrahovány z plazmy nebo tkání směsí chloroform : metanol. Dolní vrstva byla odtahována a smíchána se slabým roztokem HCl, pH 2,5. Po opakované centrifugaci byly konjugované dieny stanoveny spektrofotometricky při 233 nm v odparce dolní vrstvy rozpuštěném v heptanu (Ward et al 1985). Pro analýzu TBARS byla krevní plazma nebo homogenát tkání smíchán s 0,05N HCl a potom s 0,67% roztokem kyseliny thiobarbiturové. Po inkubaci při 95°C byly reakční produkty extrahovány směsí metanol: n-butanol 3:17 a TBARS byly stanoveny spektrofotometricky při 535 nm v butanolvé vrstvě (Naito et al 1993).

Měření biologické dostupnosti NO

Ve vzorcích krevní plazmy byla stanovena koncentrace stabilních metabolitů $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ pomocí Griessova činidla (Green et al 1982) spektrofotometricky při 543 nm.

Koncentrace cGMP byla stanovena RIA metodou použitím kitu Immunotech, Francie.

Hladiny antioxidantů

neenzymatických – vitamín E, vitamín C, glutation

Vitamin E (α - a γ -tokoferol) ve vzorcích sér byl stanoven modifikovanou HPLC metodou (Catignani 1986, Cooper et al 1997). Analyzované vzorky byly po přidání vnitřního standardu (α -tokoferolacetát) deproteinovány etanolem a extrahovány hexanem. Alikvot hexanového extraktu byl odpařen pod dusíkem a odparek rozpuštěn v mobilní fázi metanolu. 10 μl vzorku bylo nastříknuto na chromatografickou kolonu s reverzní fází C18, 5 μm . Eluce byla provedena metanolem. Tokoferoly byly detekovány fluorometricky s excitací 280nm a emisí 320nm. Koncentrace jednotlivých tokoferolů byly vyhodnoceny z kalibračních křivek hodnocením ploch jednotlivých tokoferolů a korekcí an plochy přidávaných vnitřních standardů (PC s chromatografickým integrátorem CSW-Windows).

Stanovení α - a γ -tokoferolu ve tkáních – Pro stanovení α - a γ -tokoferolu v intimě-medii aorty byly vzorky homogenizovány s roztokem kyseliny askorbové (0,002%), deproteinovány etanolem a extrahovány hexanem (Suarna 1995). Chromatografická HPLC metoda byla stejná jako u vzorků sér. Pro stanovení α - a γ -tokoferolu v myokardu byly vzorky homogenizovány

s roztokem kyseliny askorbové (25%), deproteinovány etanolem, zmýdelněny 10N KOH a extrahovány hexanem. (Kiyose et al 2001) Chromatografická HPLC metoda byla stejná jako u vzorků sér.

Stejná HPLC metoda byla použita také pro stanovení vitamínu A (retinolu) ve vzorcích sér s tím rozdílem, že jako vnitřní standard byl použit retinolacetát a detekován byl UV detekcí při 292 nm.

Vitamín C ve vzorcích sér byl stanoven jako celkový obsah kyseliny askorbové i dehydroaskorbové modifikovanou spektrofotometrickou metodou dle Roe a Kuethera (Nakagawa et al 1997). Celkové množství vitamínu C bylo odečteno z kalibrační křivky. Vzorky sér pro stanovení vitamínu C byly skladovány po deproteinaci 6% kyselinou trichloroctovou při -18°C maximálně jeden týden. Vitamín C ve vzorcích aort byl stanoven stejnou metodou, vzorky tkání byly homogenizovány s kyselinou trichlóroctovou.

Redukovaná forma glutationu byla stanovena spektrofotometrickou metodou reakcí s Elmanovým činidlem (Camera a Picardo 2002). Oxidovaná a redukovaná forma glutationu byla stanovena HPLC metodou s fluorescenční detekcí s excitací 385nm a emisí 515nm použitím diagnostického HPLC kitu firmy Chromsystem, Německo (Camera a Picardo 2002). Vzorky tkání pro stanovení glutationu byly homogenizovány za chlazení v pufru 0,025M TRIS-HCl pH=7,4.

enzymatických – SOD, CAT, GPx, GR

Aktivity antioxidantních enzymů byly sledovány spektrofotometrickými metodami reakcí činidla se substrátem nebo produktem. Aktivita superoxiddismutázy byla stanovena inhibicí reakce s tetrazolium nitro blue jako % inhibice reakce z úbytku NADH a vznikem nitroformazánu (Concetti et al 1976). Aktivita katalázy byla stanovena spektrofotometrickou reakcí peroxidu vodíku s molybdenátem amonným (Aebi 1984). Aktivita glutathionperoxidázy byla stanovena reakcí glutathionu s Elmanovým činidlem (0,01M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) (Frohe a Gunzler 1984). Aktivita glutathionreduktázy byla měřena jako úbytek NADPH při 340nm použitím Sigma kitu (Han a Han 1994). Pro stanovení aktivit antioxidantních enzymů ve tkáních byly vzorky tkání homogenizovány za chlazení v pufru 0,025M TRIS-HCl pH=7,4.

stanovení hladin proteinů

Obsah proteinů ve tkáních homogenátů byl stanoven spektrofotometrickou metodou podle Lowry (Lowry et al 1951).

4.3.2. Analýzy lipidového a sacharidového metabolismu

V krevní plazmě byly stanoveny koncentrace triglyceridů (enzymaticky po hydrolyze lipoproteinovou lipázou použitím analytické soupravy Pliva Lachema, ČR), neesterifikovaných mastných kyselin (enzymaticky po konverzi NEMK na acyl-CoA katalyzované acyl-CoA syntézou a následné oxidaci acyl-CoA syntézou použitím analytické soupravy Roche Diagnostics GmbH, Německo), glukózy (enzymaticky po deproteinaci kyselinou trichloroctovou a následné oxidaci glukózaoxidázou použitím analytické soupravy Pliva Lachema, ČR) a cholesterolu (enzymaticky po oxidaci cholesteroloxidázou použitím analytické soupravy Pliva Lachema, ČR). Koncentrace inzulínu v séru byly měřeny pomocí komerčně dostupného kitu Rat Insulin ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Sweden).

Koncentrace triglyceridů ve tkáních – Pro stanovení koncentrace triglyceridů ve vzorcích aort (*intima media*), myokardů a jater byly tkáně nejdříve rozdrceny v kapalném dusíku a extrahovány po dobu 16 hodin ve směsi chloroformu a methanolu. Poté byl přidán 2% KH_2PO_4 a roztok byl centrifugován. Organická fáze byla odebrána a odpařena v N_2 . Výsledná peleta byla rozpuštěna v isopropylalkoholu a obsah triglyceridů byl stanoven pomocí analytické soupravy (Pliva – Lachema, ČR).

Vzhledem k ustálenému značení konvenčních chovů a s ohledem na anglicky psanou literaturu bude v celé práci používáno triviálního názvosloví triglyceridy a ne systematického označení triacylglyceroly.

4.3.3. Analýzy k posouzení inzulínové senzitivity a sekrece inzulínu

Orální glukózový toleranční test (OGTT) – glukózová tolerance byla sledována pomocí orálního glukózového tolerančního testu (OGTT) po nočním lačnění. Potkanům byla sondou intragastricky podána glukóza v dávce 300mg/100g tělesné hmotnosti. Krev byla odebrána bez anestezie z ocasu v intervalech 0, 30, 60 a 120 minut po aplikaci glukózy. Dále byly sledovány i změny koncentrace inzulínu v séru. Výsledky byly hodnoceny výpočtem plochy pod křivkou ($\text{AUC}_{0-120 \text{ min}}$).

Inkorporace glukózy do glykogenu kosterního svalu – senzitivita svalové tkáně k účinku inzulínu: Syntéza glykogenu byla sledována v bránici, měřením inkorporace ^{14}C -U-glukózy do glykogenu. Sval byl izolován z potkanů po dekapitaci v sytém stavu. Bránice byla inkubována ve 3 ml Krebs-Riger bikarbonátového pufru (Tabulka 8) s přidavkem 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -U-glukózy, 5,5 mmol/l neznačené glukózy a 250mg/ml hovězího sérového albumínu (Armour, frakce V, Pharmaceut. Co.) při pH 7,4 a 37°C, v plynné fázi 95% O_2 + 5% CO_2 po

dobu 2 hodin bez či za přítomnosti inzulínu v inkubačním médiu (250 $\mu\text{U/ml}$). Po inkubaci byly z tkání extrahovány celkové lipidy dle Folche (Folche et al 1957) a glykogen způsobem, zahrnujícím var s 30% KOH a srážení v koncentrovaném ethanolu (Vrána a Kazdová 1970). Inkorporace glukózy do glykogenu kosterního svalu byla po přidavku scintilační tekutiny zjišťována měřením radioaktivity.

Lipogeneze – senzitivita tukové tkáně k účinku inzulínu: K měření inzulínem stimulované lipogeneze z glukózy bylo použito distální části epididymální tukové tkáně (200-250mg), která byla inkubována v 3ml Krebs-Ringer bikarbonátovém pufru (Tabulka 9) s přidavkem 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -U-glukózy, 5,5 mmol/l neznačené glukózy a 250 mg/ml hovězího sérového albumínu (Armour, frakce V, Pharmaceut. Co.) při pH 7,4 a 37°C, v plynné fázi 95% O_2 + 5% CO_2 po dobu 2 hodin bez či za přítomnosti inzulínu v inkubačním médiu (250 $\mu\text{U/ml}$). Po přidání scintilační tekutiny byla měřena radioaktivita.

Lipolýza – K hodnocení lipolýzy probíhající v tukové tkáni bylo použito 100 mg epididymální tukové tkáně, která byla 2 hodiny inkubována ve 3 ml Krebs-Ringer fosfátovém pufru (Tabulka 9) s přidavkem nebo bez přidavku adrenalinu (0,25 $\mu\text{g/ml}$ pufru). Ve inkubačním médiu byly kolorimetricky stanoveny koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (kit Roche Diagnostic GmbH, Německo).

Oxidace mastných kyselin – stanovena *in vitro* podle inkorporace ^{14}C palmitátu do CO_2 .

Tabulka 8: Složení Krebs-Ringer bikarbonátového pufru

Krebs-Ringer bikarbonátový pufr	
Složky	Koncentrace v mmol.l⁻¹
NaCl	118,0
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25,0

Tabulka 9: Složení Krebs-Ringer fosfátový pufru

Krebs-Ringer fosfátový pufr	
Složky	Koncentrace v mmol.l⁻¹
NaCl	118,0
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHPO ₄	25,0

4.4. Extrakce tkání a příprava intracelulárních frakcí

Vzorky tkání pro stanovení antioxidantních enzymů, lipoperoxidačních produktů a glutationu byly homogenizovány v pufru 0,025M Tris-HCl pH 7,4. Po té byly homogenizované vzorky centrifugovány při teplotě 4°C 10 min. při 3000 ot/min a ve vzorcích byl stanoven obsah bílkovin. Vzorky tkání pro stanovení α - a γ -tokoferolu byly homogenizovány s roztokem kyseliny askorbové. Koncentrace jednotlivých komponent ve vzorcích tkání je vyjádřena na hmotnost tkání nebo na obsah proteinů.

Pro separaci buněčných kompartmentů byla použita diferenciální centrifugace. Mitochondriální frakce byla separována 10 min při 10000g, mikrosomální frakce 30 min. při 100000g. Vzorky tkání byly skladovány při -80°C po dobu maximálně 6 měsíců.

4.5. Statistické metody

Data byla zpracována použitím statistického programu ANOVA. Skupiny byly porovnány použitím F-testu a oboustranného nepárového T-testu ($p < 0,05$ statistická významnost). Dále byla data zpracována regresní analýzou pomocí výpočtu korelačních koeficientů. Všechny výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm SEM.

5. VÝSLEDKY

5.1. OXIDAČNÍ STRES U METABOLICKÝCH PORUCH SPOJENÝCH S METABOLICKÝM SYNDROMEM

5.1.1. Hypertriglyceridemií indukovaný oxidační stres

Hypertriglyceridémie zvyšuje riziko rozvoje předčasné aterosklerózy a je silným a nezávislým kardiovaskulárním rizikovým faktorem. Cílem studie bylo získat dosud chybějící informace o antioxidačním systému v aortě a myokardu u experimentálních modelů s geneticky fixovanou hypertriglyceridemií.

Měření probíhala u kontrolních Wistar potkanů a u hereditárně hypertriglyceridemických potkanů s geneticky fixovanou hypertriglyceridemií (HHTg). Zvířata byla krmena vysokosacharózovou dietou po dobu 2 týdnů. HHTg potkani měli proti kontrolní skupině sníženou tělesnou hmotnost (380 ± 12 g vs 481 ± 24 g, $p < 0,01$), obě skupiny se nelišily v hmotnosti epididymálního tukového tělesa jako ukazatele viscerální tukové tkáně ($1,26 \pm 0,09$ vs $1,19 \pm 0,14$ g/100g t.v.). Vedle výrazné hypertriglyceridémie vykazovali HHTg potkani porušenou glukózovou toleranci během OGTT testu, hyperinzulinémií, zvýšené koncentrace NEMK a zhoršenou senzitivitu svalové i tukové tkáně k účinku inzulinu (tabulka 10, obrázky 6 a 7).

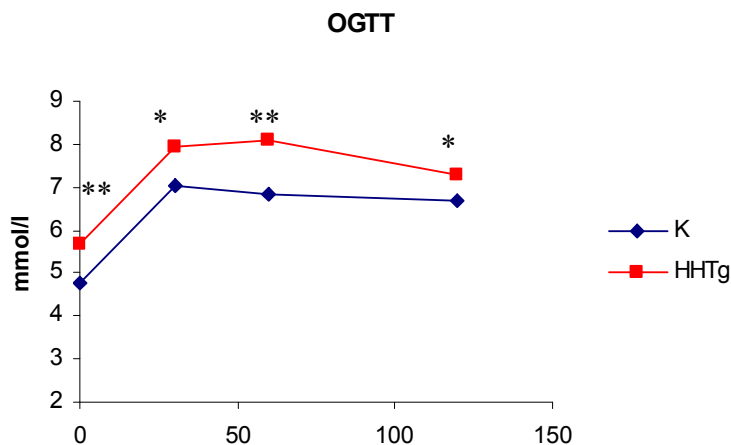
Tabulka 10 – Vliv geneticky fixované hypertriglyceridémie na metabolické parametry.

Parametr	kontroly	HHTg	P
Glykemie, mmol/l	$4,8 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,2$	N.S.
Sérový inzulin, pmol/l	156 ± 47	257 ± 73	$< 0,05$
Sérové triglyceridy, mmol/l	$1,49 \pm 0,25$	$4,94 \pm 0,27$	$< 0,001$
Sérové NEMK, mmol/l	$0,41 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,01$	$< 0,05$
Sérový cholesterol, mmol/l	$2,02 \pm 0,24$	$1,80 \pm 0,18$	N.S.
OGTT – AUC mmol/2hod	790 ± 58	907 ± 26	$< 0,05$
Triglyceridy v játrech, $\mu\text{mol/g}$	$8,61 \pm 0,68$	$11,02 \pm 0,70$	$< 0,01$
Triglyceridy v m. soleus, $\mu\text{mol/g}$	$3,68 \pm 0,43$	$6,36 \pm 0,68$	$< 0,001$

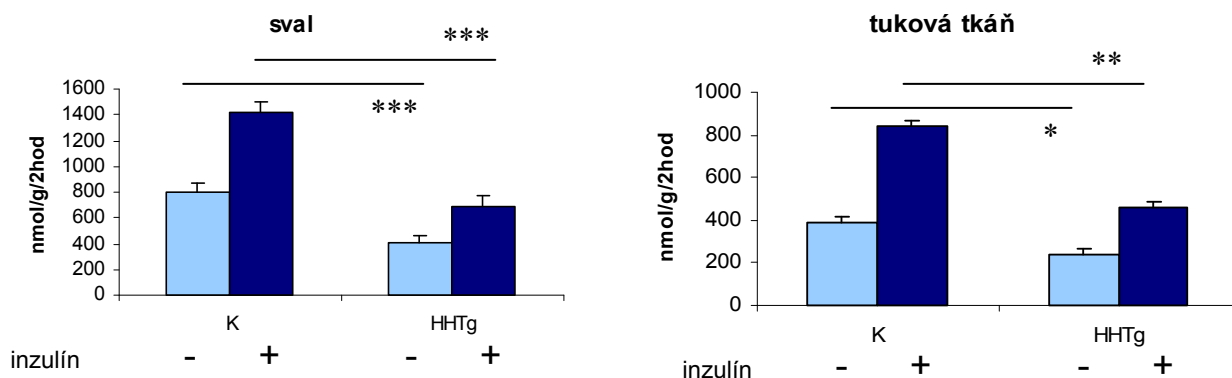
Hodnoty udávají průměr \pm SE, počet zvířat ve skupině 6-10.

Obrázek 6 – Průběh OGTT u kontrolních a hypertriglyceridemických potkanů.

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).



Obrázek 7 – Vliv geneticky fixované hypertriglyceridémie na senzitivitu tkání k účinkům inzulinu. Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).



Výrazně zvýšené koncentrace triglyceridů v séru byly u potkanů s hereditární hypertriglyceridemií spojeny s nárůstem lipoperoxidačních produktů v séru a se snížením hladin α -, γ -tokoferolu i glutationu a rovněž s poklesem aktivit antioxidačních enzymů SOD, katalázy i glutationreduktázy (tabulka 11).

Tabulka 11 – Vliv hypertriglyceridémie na parametry oxidačního stresu v séru/plasmě.

SERUM / PLASMA	kontroly	HHTg	P
Tg (mmol/l)	1,49 ± 0,25	4,94 ± 0,27	< 0,001
GSH (mmol/l)	3,49 ± 0,17	2,76 ± 0,22	< 0,05
αToc (μmol/l)	22,22 ± 1,76	34,96 ± 1,44	< 0,001
γToc (μmol/l)	0,210 ± 0,046	0,446 ± 0,025	< 0,001
αToc/Tg (μmol/mmol)	16,05 ± 2,60	7,21 ± 0,32	< 0,001
γToc/Tg (μmol/mmol)	0,148 ± 0,035	0,092 ± 0,006	< 0,05
SOD (U/ml)	3,940 ± 0,116	2,925 ± 0,376	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/ml)	562 ± 9	439 ± 17	< 0,01
GPx (μmol GSH/min/ml)	432 ± 43	347 ± 27	NS
GR (μmol NADPH/min/ml)	355 ± 33	237 ± 14	< 0,01
TBARS (nmol/l)	0,471 ± 0,066	0,854 ± 0,082	< 0,05
CD (nmol/l)	19,11 ± 1,81	25,64 ± 1,83	< 0,05

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (6-10 zvířat ve skupině).

Kontroly – potkani kmene Wistar

HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani inzulino resistantní

Dieta – vysokosacharózová po dobu 2 týdnů

Stáří zvířat – 4-6 měsíců

Tabulka 12 – Vliv hypertriglyceridémie na parametry oxidačního stresu v aortě.

AORTA	kontroly	HHTg	P
Tg (μmol/g)	1,54 ± 0,14	5,03 ± 0,49	< 0,001
GSH (μmol/mg)	0,765 ± 0,088	0,486 ± 0,042	< 0,01
αToc (nmol/g)	28,08 ± 3,22	29,77 ± 3,20	NS
γToc (nmol/g)	0,780 ± 0,112	0,671 ± 0,109	NS
αToc/Tg (nmol/μmol)	19,12 ± 3,73	6,31 ± 1,07	< 0,01
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,506 ± 0,120	0,148 ± 0,038	< 0,01
TBARS (nmol/g)	0,37 ± 0,05	0,56 ± 0,07	< 0,05
CD (nmol/g)	5,50 ± 0,30	7,52 ± 0,70	< 0,05

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (6-10 zvířat ve skupině).

Kontroly – potkani kmene Wistar

HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani inzulino resistantní

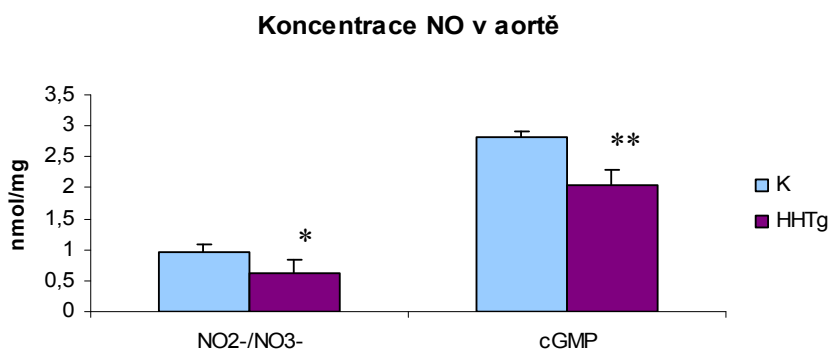
Dieta – vysokosacharózová po dobu 2 týdnů

Stáří zvířat – 4-6 měsíců

Zvýšená akumulace triglyceridů v aortě vedla u HHTg potkanů proti kontrolní skupině k nárůstu lipoperoxidace a ke snížení hladin glutationu, α - i γ -tokoferolu v aortě (tabulka 12). HHTg potkani vykazovali rovněž o 30% sníženou koncentraci cGMP a o 20% sníženou koncentraci NO v aortě (obrázek 8).

Obrázek 8 – Koncentrace NO v aortě.

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).



Naproti tomu snížené koncentrace glutationu v myokardu, pokles aktivit SOD a GPx a zvýšení lipoperoxidace neovlivnily koncentrace α - i γ -tokoferolu v myokardu (tabulka 13).

Tabulka 13 – Vliv hypertriglyceridémie na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	kontroly	HHTg	P
Tg ($\mu\text{mol/g}$)	$3,01 \pm 0,25$	$3,72 \pm 0,31$	NS
GSH (mmol/mg protein)	$3,07 \pm 0,29$	$1,12 \pm 0,16$	< 0,01
αToc (nmol/g)	$55,09 \pm 9,50$	$66,19 \pm 7,35$	NS
γToc (nmol/g)	$0,453 \pm 0,012$	$0,841 \pm 0,088$	NS
αToc/Tg (nmol/ μmol)	$18,30 \pm 2,39$	$17,79 \pm 2,09$	NS
γToc/Tg (nmol/ μmol)	$0,159 \pm 0,023$	$0,229 \pm 0,025$	NS
SOD (U/mg protein)	$1,065 \pm 0,098$	$0,614 \pm 0,173$	NS
CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$)	586 ± 7	555 ± 13	NS
GPx ($\mu\text{mol GSH/min/mg protein}$)	680 ± 24	435 ± 44	< 0,01
GR ($\mu\text{mol NADPH/min/mg protein}$)	170 ± 33	149 ± 21	NS
TBARS (nmol/mg protein)	$0,84 \pm 0,20$	$1,33 \pm 0,19$	< 0,05
CD (nmol/mg protein)	$23,41 \pm 0,04$	$35,26 \pm 5,46$	< 0,05

Data jsou uváděna jako průměry \pm SEM (6-10 zvířat ve skupině).

Kontroly – potkani kmene Wistar

HHTg – hereditálně hypertriglyceridemičtí potkani inzulino resistantní

Dieta – vysokosacharózová po dobu 2 týdnů

Stáří zvířat – 4-6 měsíců

Obrázek 9 - Korelace TG/TBARS (A), TG/ γ E (B) a TG/GSH (C) v plasmě u HHTg potkanů.

Serum

TG, mM/l

TBARS, μ M/l

$R=0.75$
 $p<0.001$

Serum

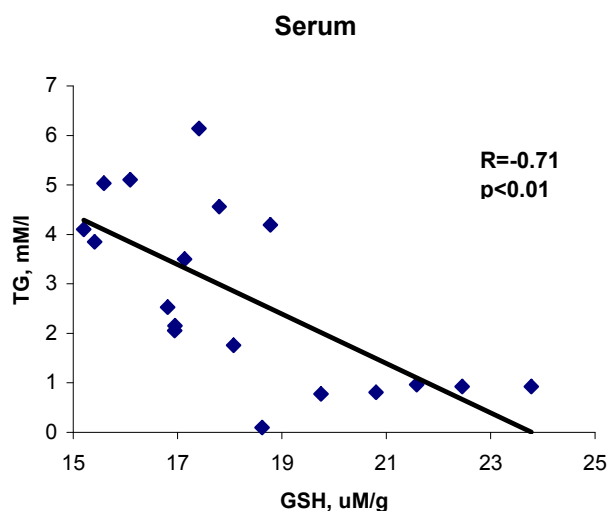
TG, mM/l

Tocopherol gamma. uM/l

$R=-0.75$
 $p<0.001$

Tocopherol gamma. uM/l	TG, mM/l
0.15	4.2
0.17	4.1
0.19	5.0
0.24	3.8
0.25	5.1
0.28	3.4
0.38	0.9
0.43	6.1
0.44	0.8
0.45	0.8
0.48	1.7
0.55	2.0
0.60	2.1
0.65	0.7
0.65	2.5
0.66	0.0

C



Závěr : Akumulace triglyceridů v aortě u HHTg potkanů byla spojena s výrazným snížením antioxidantů v aortě spolu se zvýšenou tvorbou lipoperoxidačních produktů. Snížené koncentrace α - a γ -tokoferolu v arteriální stěně mohou přispět k zvýšení lipoperoxidace a mohou ovlivnit oxidabilitu lipoproteinových částic. Zvýšení oxidačního stresu v aortě a myokardu u HHTg potkanů v kombinaci se snížením biologické dostupnosti NO se mohou uplatňovat v rozvoji kardiovaskulárního poškození při hypertriglyceridémii a inzulinové rezistenci.

5.1.2. Změny parametrů oxidačního stresu v závislosti na věku zvířat

Přibývajícím věkem patří mezi další faktory, které mohou ovlivnit oxidační stres a jeho negativní důsledky na rozvoj metabolického syndromu a který může přispět k rozvoji kardiovaskulárních komplikací. I když zvýšená prevalence diabetu i kardiovaskulárních onemocnění v průběhu stárnutí byla pozorována v řadě klinických studií (Yki-Järvinen 1995), zůstávají mechanismy rozvoje oxidačního stresu s přibývajícím věkem neobjasněny.

Cílem studie bylo sledovat parametry oxidačního stresu s narůstajícím věkem.

Měření probíhala u kontrolních Wistar potkanů a u hereditálně hypertriglyceridemických potkanů s geneticky fixovanou hypertriglyceridemií.

S přibývajícím věkem došlo u kontrolních i HHTg potkanů ke zvýšení tělesné hmotnosti i epididymálního tukového tělesa a k poklesu aktivit antioxidantních enzymů, především katalázy a glutathionperoxidázy, v séru byla také snížena aktivita SOD. Přibývajícím věkem byl rovněž spojen s nárůstem lipoperoxidačních produktů v séru a mírně i v myokardu (tabulky 14 a 15). Narůstající věk vedl u kontrolních i HHTg potkanů ke snížení glutathionu v séru i myokardu. U kontrolních zvířat se s věkem snížily koncentrace glutathionu v myokardu o 60%. Naproti tomu přibývajícím věkem neovlivnil koncentrace α - a γ -tokoferolu v séru u kontrolních ani HHTg potkanů. V myokardu se u kontrolních potkanů s věkem zvýšily koncentrace γ -tokoferolu, naproti tomu u HHTg potkanů došlo s narůstajícím věkem k poklesu hladin α - i γ -tokoferolu (tabulka 15).

Tabulka 14 – Vliv věku na parametry oxidačního stresu v séru / plasmě.

SERUM / PLASMA	mladé-kontroly	staré-kontroly	P	mladé-HHTg	staré-HHTg	P
Tg (mmol/l)	1,49 ± 0,25	1,84 ± 0,34	NS	4,94 ± 0,27	4,80 ± 0,34	NS
GSH (mmol/l)	3,49 ± 0,17	2,26 ± 0,34	*	2,76 ± 0,22	1,78 ± 0,16	**
αToc (μ mol/l)	22,22 ± 1,76	30,77 ± 1,36	**	34,97 ± 1,44	36,73 ± 2,28	NS
γToc (μ mol/l)	0,210 ± 0,046	0,512 ± 0,081	*	0,446 ± 0,025	0,491 ± 0,054	NS
αToc/Tg (μ mol/mmol)	16,05 ± 2,59	19,81 ± 4,39	NS	7,21 ± 0,32	7,79 ± 0,36	NS
γToc/Tg (μ mol/mmol)	0,148 ± 0,035	0,251 ± 0,082	NS	0,092 ± 0,006	0,102 ± 0,007	NS
SOD (U/ml)	3,940 ± 0,116	1,926 ± 0,617	*	2,925 ± 0,376	1,291 ± 0,252	**
CAT (μ mol H ₂ O ₂ /min/ml)	562 ± 9	473 ± 33	*	439 ± 17	302 ± 25	***
GPx (μ mol GSH/min/ml)	432 ± 43	441 ± 34	NS	347 ± 27	264 ± 24	*
GR (μ mol NADPH/min/ml)	355 ± 33	305 ± 46	NS	237 ± 14	224 ± 29	NS
TBARS (nmol/l)	0,401 ± 0,091	0,924 ± 0,135	*	0,854 ± 0,082	1,646 ± 0,166	***
CD (nmol/l)	19,11 ± 1,81	20,79 ± 3,39	*	25,64 ± 1,83	33,12 ± 1,80	**

Tabulka 15 – Vliv věku na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	mladé-kontroly	staré-kontroly	P	mladé-HHTg	staré-HHTg	P
GSH (mmol/mg protein)	3,07 ± 0,29	1,12 ± 0,14	***	1,12 ± 0,16	0,87 ± 0,29	*
αToc (nmol/g)	71,68 ± 13,50	75,95 ± 5,88	NS	86,10 ± 2,77	69,21 ± 6,83	*
γToc (nmol/g)	0,438 ± 0,012	0,753 ± 0,081	*	0,814 ± 0,066	0,550 ± 0,049	**
SOD (U/mg protein)	1,065 ± 0,099	1,038 ± 0,147	NS	0,614 ± 0,173	0,596 ± 0,272	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg prot)	586 ± 7	467 ± 24	*	555 ± 13	422 ± 18	***
GPx (μmol GSH/min/mg prot)	680 ± 24	281 ± 6	**	435 ± 44	209 ± 40	**
GR (μmol NADPH/min/mg prot)	170 ± 33	94 ± 10	*	149 ± 21	108 ± 15	NS
TBARS (nmol/mg protein)	0,84 ± 0,20	1,65 ± 0,19	*	1,33 ± 0,19	1,94 ± 0,29	*
CD (nmol/mg protein)	23,41 ± 0,04	40,53 ± 2,17	*	35,26 ± 5,46	41,65 ± 1,55	NS

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (5-6 zvířat ve skupině).

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).

mladé kontroly – potkani kmene Wistar ve věku 4 měsíců

staré kontroly – potkani kmene Wistar ve věku 16 měsíců

mladé HHTg – HHTg potkani ve věku 4 měsíců

staré HHTg – HHTg potkani ve věku 16 měsíců

Dieta – vysokosacharózová po dobu 2 týdnů

Stáří zvířat – 4 a 16 měsíců

Závěr : Výsledky ukazují, že jedním z mechanismů, kterým metabolické poruchy provázející metabolický syndrom, mohou zvyšovat riziko rozvoje diabetu 2.typu a jeho kardiovaskulárních komplikací je oxidační stres, na kterém se může podílet pokles aktivit antioxidačního systému s narůstajícím věkem.

5.1.3. Vliv obezity na oxidační stres

Obezita patří mezi důležité komponenty metabolického syndromu a zejména je-li spojena s hypertriglyceridémií zvyšuje riziko rozvoje předčasné aterosklerózy.

V naší studii jsme sledovali vliv nutričně nebo geneticky fixované obezity na parametry oxidačního stresu v aortě a myokardu u experimentálních modelů inzulínové rezistence.

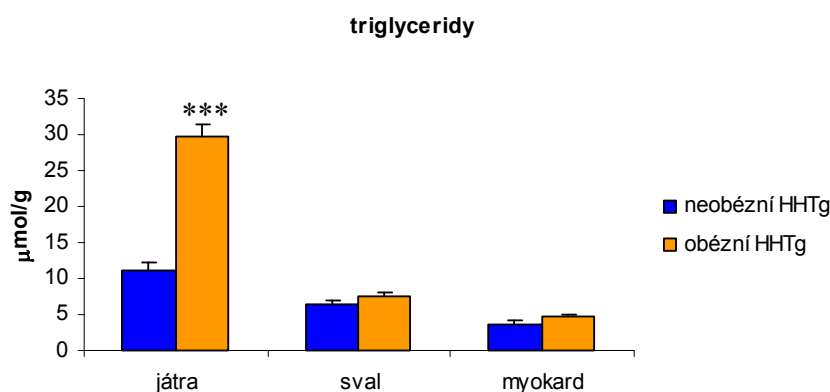
5.1.3.1. Vliv nutričně vyvolané obezity dlouhodobým podáváním vysokosacharóзовé diety

Obezita byla u HHTg potkanů vyvolána dlouhodobým podáváním vysokosacharóзовé diety po dobu 4 měsíců. Obézní HHTg potkani vykazovali vyšší tělesnou váhu (531 ± 34 g vs 380 ± 12 g, $p < 0,01$) a zvýšenou hmotnost epididymálního tukového tělesa ($2,18 \pm 0,14$ g/100g t.m. vs $1,26 \pm 0,09$ g/100g t.m., $p < 0,001$). Nutričně indukovaná obezita zvýšila u HHTg potkanů glykémii ($5,82 \pm 0,18$ mmol/l vs $4,91 \pm 0,17$ mmol/l, $p < 0,01$) i hladiny cholesterolu v séru ($2,09 \pm 0,05$ mmol/l vs $1,80 \pm 0,18$ mmol/l, $p < 0,05$).

Nutričně indukovaná obezita u HHTg potkanů byla spojena s výraznou hypertriglyceridémií a se zvýšenou akumulací triglyceridů v játrech (obrázek 10).

Obrázek 10 – hladiny tkáňových triglyceridů u neobézních a obézních HHTg potkanů.

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (*t*-test).



Tabulka 16 – Vliv nutričně indukované obezity dlouhodobým podáváním vysokosacharóзовé diety na parametry oxidačního stresu v séru / plazmě.

SERUM / PLASMA	neobézní-HHTg	obézní-HHTg	P
Tg (mmol/l)	4,90 ± 0,27	7,13 ± 0,40	< 0,01
GSH (mmol/l)	1,85 ± 0,13	1,66 ± 0,05	NS
αToc (μmol/l)	20,67 ± 1,39	20,19 ± 1,54	NS
γToc (μmol/l)	0,549 ± 0,038	0,252 ± 0,036	< 0,001
αToc/Tg (μmol/mmol)	11,97 ± 1,99	4,48 ± 2,29	< 0,01
γToc/Tg (μmol/mmol)	0,313 ± 0,042	0,056 ± 0,007	< 0,001
SOD (U/ml)	0,897 ± 0,121	0,643 ± 0,098	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/ml)	573 ± 54	342 ± 38	< 0,01
GPx (μmol GSH/min/ml)	279 ± 14	237 ± 13	< 0,01
TBARS (nmol/l)	1,037 ± 0,143	1,333 ± 0,052	< 0,01
CD (nmol/l)	38,82 ± 1,77	45,80 ± 1,90	< 0,01

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (5-7 zvířat ve skupině).

neobézní HHTg – HHTg potkání krmení vysokosacharóзовou dietou po dobu 2 týdnů

obézní HHTg - HHTg potkání krmení vysokosacharóзовou dietou po dobu 4 měsíců

Dieta – vysokosacharóзовá po dobu 2 týdnů nebo 4 měsíců

Stáří zvířat – 16 měsíců

Nárůst lipoperoxidačních produktů v séru i myokardu byl spojen se snížením hladin α-tokoferolu, výrazným snížením γ-tokoferolu a poklesem aktivit katalázy a glutathionperoxidázy v séru i v sledovaných tkáních (tabulky 16, 17 a 18). Naopak obezita neovlivnila aktivitu SOD ani koncentrace glutathionu v séru ani v myokardu (tabulky 16 a 18).

Tabulka 17 – Vliv nutričně indukované obezity dlouhodobým podáváním vysokosacharóзовé diety na parametry oxidačního stresu v aortě.

AORTA	neobézní-HHTg	obézní-HHTg	P
Tg (μmol/g)	3,88 ± 0,23	4,69 ± 0,39	NS
αToc (nmol/g)	67,89 ± 8,84	34,45 ± 6,74	< 0,05
γToc (nmol/g)	1,798 ± 0,301	0,816 ± 0,215	< 0,05
αToc/Tg (nmol/μmol)	17,34 ± 1,54	8,33 ± 2,11	< 0,05
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,459 ± 0,062	0,203 ± 0,064	< 0,05

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (5-7 zvířat ve skupině).

neobézní HHTg – HHTg potkání krmení vysokosacharóзовou dietou po dobu 2 týdnů

obézní HHTg - HHTg potkání krmení vysokosacharóзовou dietou po dobu 4 měsíců

Dieta – vysokosacharóзовá po dobu 2 týdnů nebo 4 měsíců

Stáří zvířat – 16 měsíců

Tabulka 18 – Vliv nutričně indukované obezity dlouhodobým podáváním vysokosacharóзовé diety na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	neobézní-HHTg	obézní-HHTg	P
Tg (μmol/g)	3,73 ± 0,34	4,81 ± 0,48	NS
GSH (mmol/mg protein)	2,27 ± 0,09	1,91 ± 0,14	NS
αToc (nmol/g)	64,10 ± 8,47	60,72 ± 4,34	NS
γToc (nmol/g)	1,016 ± 0,180	0,507 ± 0,047	< 0,01
αToc/Tg (nmol/μmol)	17,185 ± 0,921	13,624 ± 0,393	NS
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,274 ± 0,015	0,105 ± 0,004	< 0,01
SOD (U/mg protein)	0,855 ± 0,101	0,783 ± 0,078	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	302 ± 11	292 ± 15	NS
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	758 ± 41	551 ± 31	< 0,01
TBARS (nmol/mg protein)	1,11 ± 0,10	1,47 ± 0,09	< 0,01
CD (nmol/mg protein)	13,76 ± 1,17	16,56 ± 0,61	< 0,01

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (5-7 zvířat ve skupině).

neobézní HHTg – HHTg potkani krmeni vysokosacharózovou dietou po dobu 2 týdnů

obézní HHTg - HHTg potkani krmeni vysokosacharózovou dietou po dobu 4 měsíců

Dieta – vysokosacharózová po dobu 2 týdnů nebo 4 měsíců

Stáří zvířat – 16 měsíců

5.1.3.2. Vliv geneticky fixované obezity u kmene Koletského SHR potkanů

Obézní SHR potkani měli v porovnání se svými štíhlými sourozenci zvýšenou tělesnou hmotnost (652±52g vs 289±24g, p<0,001) i zvýšenou hmotnost viscerální tukové tkáně (epididymální tukové těleso 1,47±0,13 g/100g t.h. vs 1,12±0,01 g/100g t.h., p<0,01). Koncentrace sérových triglyceridů byly zvýšeny na dvojnásobné hodnoty, zatímco glykémie nebyla rozdílná (5,9±0,2 mmol/l vs 5,4±0,3 mmol/l, NS). Obézní SHR potkani se nelišili v porovnání se svými štíhlými sourozenci v sérových koncentracích α- a γ-tokoferolu / Tg (tabulka 19), měli však výrazně snížené koncentrace α- i γ-tokoferolu v aortě (obrázek 11).

Tabulka 19 – Vliv geneticky fixované obezity na parametry oxidačního stresu v séru.

SERUM / PLASMA	SHR / Koletsky	SHROB / Koletsky	P
Tg (mmol/l)	1,14 ± 0,20	2,51 ± 0,23	< 0,001
αToc (μmol/l)	17,92 ± 3,28	33,91 ± 3,38	< 0,01
γToc (μmol/l)	0,480 ± 0,083	1,168 ± 0,126	< 0,01
αToc/Tg (μmol/mmol)	17,96 ± 2,30	13,97 ± 1,78	NS
γToc/Tg (μmol/mmol)	0,485 ± 0,060	0,479 ± 0,061	NS

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (5-6 zvířat ve skupině).

SHR / Koletsky

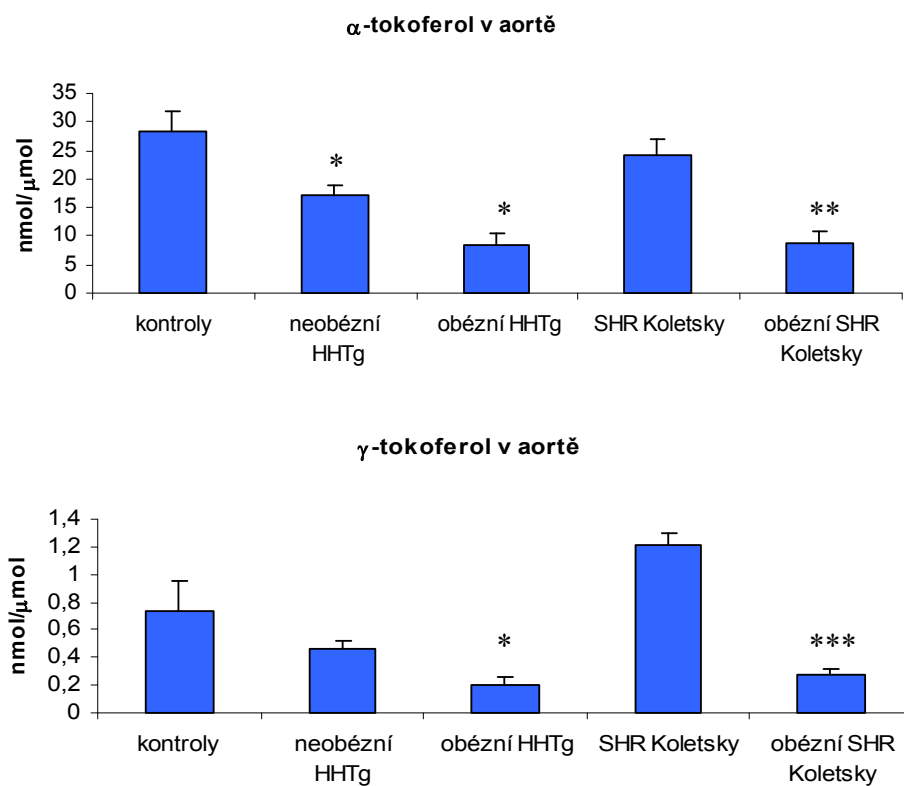
SHROB / Koletsky

Dieta – vysokosacharózová po dobu 4 týdnů

Stáří zvířat – 3 měsíce

Obrázek 11 – Vliv nutričně a geneticky fixované obezity na koncentrace α- a γ-tokoferolu

v aortě. Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).



Závěr : Nižší koncentrace α - i γ -tokoferolu v aortách HHTg potkanů byly dále sníženy nutričně indukovanou obezitou. Koncentrace α - i γ -tokoferolu v aortě byly výrazně sníženy i u geneticky obézních potkanů. Nižší koncentrace α - i γ -tokoferolu v arteriální stěně při obezitě se mohou uplatnit v rozvoji vaskulárních poruch – zvýšením lipoperoxidace a nižší dostupností oxidu dusnatého. Sérové koncentrace nemusí vždy odrážet jejich hladiny ve tkáních, neboť sérové koncentrace α -tokoferolu nebyly rozdílné mezi kontrolními, neobézními a obézními HHTg potkany.

5.1.4. Hypertenze a oxidační stres

5.1.4.1. Vliv juvenilní hypertenze na parametry oxidačního stresu

Jedním z faktorů definujících metabolický syndrom a často doprovázející diabetes je také hypertenze. V patogenezi hypertenze a endoteliální dysfunkce se rovněž může uplatnit oxidační stres. Mnoho studií klinických i experimentálních podpořilo úlohu oxidačního stresu při hypertenzi, nicméně přesný mechanismus není znám. Observačních klinických studií je jen velmi málo, skupinou juvenilních hypertoniků se dosud nezabývala žádná klinická studie. Sledovali jsme proto u skupiny pacientů s esenciální juvenilní hypertenzí a u kontrolní skupiny sérové koncentrace vitamínů A, E a C, dále MDA, NO, některé lipidové a sacharidové parametry.

Do této skupiny bylo zařazeno 49 juvenilních esenciálních hypertoniků. Kontrolní skupinu tvořilo 94 subjektů stejné věkové kategorie. Věková hranice v obou skupinách nepřekročila 30 let. Pacienti byli bez medikamentózní léčby a všechny subjekty byli bez suplementace vitamínovými preparáty. Klinické a biochemické parametry shrnuje tabulka 20.

Tabulka 20 – Charakteristika klinického souboru skupiny juvenilních hypertoniků a kontrolní skupiny.

	normotenzní n=94	hypertenzní n=49	P
pohlaví (ženy/muži)	50/44	4/45	
věk (roky)	29,30 ± 3,21	23,70 ± 3,17	NS
krevní tlak systolický (mmHg)	113,59 ± 12,46	128,60 ± 9,47	< 0,001
krevní tlak diastolický (mmHg)	72,97 ± 6,08	81,08 ± 5,35	< 0,001
pulz (tepy/min)	71,16 ± 6,86	74,25 ± 9,09	< 0,05
váha (kg)	68,23 ± 13,80	81,57 ± 15,01	< 0,001
BMI (kg/m ²)	23,11 ± 2,97	26,60 ± 4,95	< 0,01
glykémie (mmol/l)	4,91 ± 0,48	5,05 ± 0,52	NS

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM..

Výsledky naší studie ukázaly, že juvenilní hypertenze byla spojena s významně nižšími sérovými hladinami kyseliny askorbové a α -tokoferolu v přepočtu na lipidové parametry. Skupina s juvenilní hypertenzí měla rovněž významně vyšší hladinu sérových triglyceridů. Skupiny se nelišily v hodnotě NO, který je důležitým vazodilatačním faktorem (tabulka 21). Regresní analýzou jsem zjistili korelaci α - a γ -tokoferolu s hladinami cholesterolu a triglyceridů, naproti tomu vitamín C nekoreloval ani s vitamínem E ani s hladinami lipidů (tabulka 22).

Tabulka 21 – Vliv juvenilní hypertenze na parametry oxidačního stresu a některé lipidové parametry.

PLASMA	normotenzní n=94	hypertenzní n=49	P
α Toc (μ mol/l)	26,66 \pm 7,09	26,65 \pm 6,92	NS
γ Toc (μ mol/l)	2,36 \pm 1,17	2,51 \pm 1,15	NS
AA (μ mol/l)	71,91 \pm 19,92	65,01 \pm 17,48	< 0,05
retinol (μ mol/l)	1,81 \pm 0,32	2,15 \pm 0,46	NS
chol (mmol/l)	4,82 \pm 0,95	4,79 \pm 0,81	NS
Tg (mmol/l)	1,08 \pm 0,59	1,51 \pm 0,69	< 0,001
MDA (nmol/l)	2,39 \pm 0,83	2,45 \pm 0,95	NS
NO (nmol/l)	25,57 \pm 8,55	33,55 \pm 10,81	NS
α Toc / chol+Tg	4,57 \pm 1,03	4,24 \pm 0,75	< 0,05
γ Toc / chol+Tg	0,41 \pm 0,18	0,41 \pm 0,18	NS
α Toc / γ Toc	13,24 \pm 6,29	12,01 \pm 4,51	NS
AA / α Toc	2,86 \pm 1,00	2,59 \pm 0,91	NS
AA / γ Toc	37,38 \pm 20,10	31,30 \pm 16,18	NS

Data jsou uváděna jako průměry \pm SEM.

Tabulka 22 – Korelační koeficienty závislosti vitamínů E a C na lipidových parametrech.

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).

	AA	α Toc	γ Toc
α Toc	0,1012 NS		
γ Toc	0,1283 NS	0,3486 ***	
chol	0,1330 NS	0,7056 ***	0,2257 **
Tg	0,1154 NS	0,5122 ***	0,2589 **
chol + Tg	0,1499 NS	0,7432 ***	0,2870 **

Závěr : Výsledky ukazují, že juvenilní hypertenze byla spojena se zvýšeným oxidačním stresem a to v době, kdy nebyly rozdíly v koncentracích NO, který je ukazatelem vazodilatace. Ke zvýšení oxidačního stresu přispěly především snížené hladiny kyseliny askorbové a α -tokoferolu.

5.1.5. Hyperglykemií indukovaný oxidační stres

Cílem pokusu bylo sledování především tkáňových parametrů oxidačního stresu u experimentálního diabetu. Měření probíhala u kontrolních Wistar potkanů a Wistar potkanů, u kterých byl vyvolán diabetes jednorázovým podáním streptozotocínu v dávce i.v. 55 mg/ kg tělesné hmotnosti 4 týdny před ukončením pokusu.

Podání streptozotocínu snížilo tělesnou hmotnost (252 ± 6 g vs 290 ± 14 g, $p < 0,02$) a výrazně zvýšilo glykémii ($20,70 \pm 1,16$ vs $5,63 \pm 0,18$ mmol/l, $p < 0,001$). Diabetická zvířata vykazovala výrazné zhoršení parametrů oxidačního stresu v séru proti kontrolní skupině. Zvýšení lipoperoxidace v séru bylo spojeno se snížením všech sledovaných neenzymatických antioxidantů i poklesem aktivit enzymatických antioxidačních enzymů v séru (tabulka 23).

Tabulka 23 – Parametry oxidačního stresu v séru/plasmě u experimentálního diabetu

SERUM / PLASMA	kontroly	dia	P
Tg (mmol/l)	$1,35 \pm 0,13$	$1,60 \pm 0,16$	NS
GSH (mmol/l)	$3,83 \pm 0,22$	$1,40 \pm 0,21$	$< 0,001$
αToc (μ mol/l)	$31,39 \pm 5,69$	$20,61 \pm 1,48$	NS
γToc (μ mol/l)	$0,758 \pm 0,080$	$0,337 \pm 0,029$	$< 0,001$
αToc/Tg (μ mol/mmol)	$24,97 \pm 4,33$	$14,15 \pm 2,27$	$< 0,05$
γToc/Tg (μ mol/mmol)	$0,606 \pm 0,072$	$0,227 \pm 0,030$	$< 0,001$
AA (μ mol/l)	$58,58 \pm 10,76$	$48,40 \pm 3,87$	NS
SOD (U/ml)	$3,291 \pm 0,339$	$1,440 \pm 0,290$	$< 0,01$
CAT (μ mol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	743 ± 33	530 ± 36	$< 0,01$
GPx (μ mol GSH/min/mg protein)	400 ± 17	212 ± 35	$< 0,01$
TBARS (nmol/l)	$0,471 \pm 0,066$	$0,999 \pm 0,107$	$< 0,01$
CD (nmol/l)	$13,60 \pm 1,06$	$34,04 \pm 2,57$	$< 0,001$

Data jsou uváděna jako průměry \pm SEM (6-10 zvířat ve skupině).

Kontroly – potkani kmene Wistar

Dia – potkani kmene Wistar po podání streptozotocín i.v. 55mg / kg t.hm 4 týdny před ukončením pokusu

Dieta – standardní laboratorní

Stáří zvířat – 2-3 měsíce

Překvapivým nálezem byly zvýšené hladiny α -tokoferolu v aortě, které byly spojeny se zvýšenými hladinami produktů lipoperoxidace (tabulka 24). Koncentrace γ -tokoferolu se nelišily v aortě ani v myokardu. Zvýšenou akumulaci α -tokoferolu v aortě po navození diabetu jsme pozorovali také u SHR potkanů a transgenních SHR potkanů se zvýšenou expresí SREBP-1c transkripčního faktoru (obrázek 12).

Tabulka 24 – Parametry oxidačního stresu v aortě u experimentálního diabetu

AORTA	kontroly	dia	P
Tg ($\mu\text{mol/g}$)	1,35 \pm 0,14	2,53 \pm 0,29	< 0,01
GSH ($\mu\text{mol/mg}$)	0,494 \pm 0,025	0,574 \pm 0,034	NS
αToc (nmol/g)	28,08 \pm 3,22	77,56 \pm 5,44	< 0,001
γToc (nmol/g)	0,780 \pm 0,112	1,593 \pm 0,104	NS
αToc/Tg (nmol/ μmol)	19,12 \pm 3,73	31,43 \pm 2,68	< 0,05
γToc/Tg ($\nu\text{mol}/\mu\text{mol}$)	0,51 \pm 0,12	0,71 \pm 0,07	NS
AA ($\mu\text{mol/g}$)	77,14 \pm 8,50	96,58 \pm 12,09	NS
TBARS (nmol/g)	0,471 \pm 0,066	0,999 \pm 0,107	< 0,01

Data jsou uváděna jako průměry \pm SEM (6-10 zvířat ve skupině).

Kontroly – potkani kmene Wistar

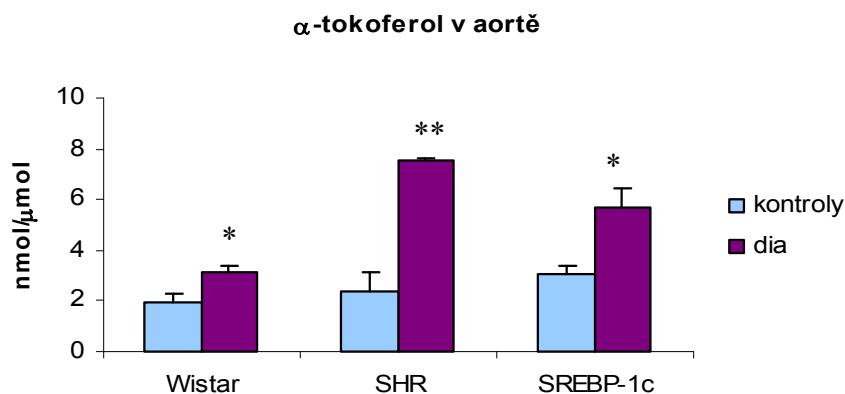
Dia – potkani kmene Wistar po podání streptozotocin i.v. 55mg / kg t.hm 4 týdny před ukončením pokusu

Dieta – standardní laboratorní

Stáří zvířat - 2-3 měsíce

Obrázek 12 – Koncentrace α -tokoferolu v aortě u streptozotocinového diabetu u Wistar potkanů, SHR potkanů a transgenních SHR potkanů s overexpresí SREBP-1c. Koncentrace γ -tokoferolu v aortě nebyly rozdílné.

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).



Zvýšená lipoperoxidace v myokardu u diabetických zvířat byla spojena s nižšími hladinami glutationu a poklesem aktivit SOD, katalázy i glutationperoxidázy (tabulka 25).

Tabulka 25 – Parametry oxidačního stresu v myokardu u experimentálního diabetu

MYOKARD	kontroly	dia	P
Tg (μmol/g)	2,83 ± 0,23	3,49 ± 0,25	NS
GSH (mmol/mg protein)	3,01 ± 0,39	1,74 ± 0,22	< 0,001
αToc (nmol/g)	53,46 ± 3,96	60,36 ± 5,84	NS
γToc (nmol/g)	0,764 ± 0,093	0,788 ± 0,032	NS
αToc/Tg (nmol/μmol)	20,19 ± 2,29	17,83 ± 1,99	NS
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,28 ± 0,02	0,23 ± 0,02	NS
SOD (U/mg protein)	1,072 ± 0,098	0,670 ± 0,075	< 0,01
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	362 ± 20	259 ± 25	< 0,01
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	844 ± 28	668 ± 31	< 0,01
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	71 ± 6	128 ± 16	< 0,01
TBARS (nmol/mg protein)	0,593 ± 0,061	1,110 ± 0,165	< 0,05
CD (nmol/mg protein)	8,796 ± 1,033	18,374 ± 1,618	< 0,001

Tabulka 26 – Parametry oxidačního stresu v buněčných frakcích myokardu u experimentálního diabetu

MYOKARD - buněčné frakce	kontroly	dia	P
mitochondriální frakce			
αToc (μmol/mg protein)	81,051 ± 12,226	145,853 ± 9,686	< 0,01
γToc (μmol/mg protein)	1,594 ± 0,223	2,126 ± 0,214	NS
mikrosomální frakce			
αToc (μmol/mg protein)	362,25 ± 21,01	365,86 ± 27,43	NS
γToc (μmol/mg protein)	6,053 ± 0,555	5,270 ± 0,553	NS
cytosol			
GSH (mmol/mg protein)	7,52 ± 0,63	5,17 ± 0,47	< 0,05
AA (μmol/l)	76,53 ± 6,57	52,40 ± 3,87	< 0,01
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	193 ± 14	166 ± 9	NS
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	653 ± 40	506 ± 37	< 0,05

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (6-10 zvířat ve skupině).

Kontroly – potkani kmene Wistar

Dia – potkani kmene Wistar po podání streptozotocin i.v. 55mg / kg t.hm 4 týdny před ukončením pokusu

Dieta – standardní laboratorní

Stáří zvířat – 2-3 měsíce

Při sledování koncentrací antioxidantů v buněčných frakcích myokardu jsme zjistili, že akumulaci α -tokoferolu vykazovaly mitochondriální membrány, naopak v cytosolu došlo u diabetických zvířat k poklesu hladin glutationu a askorbátu a snížení aktivity glutationperoxidázy (tabulka 26).

Závěr : Uvedené výsledky ukazují, že sérové koncentrace α - a γ -tokoferolu a vitamínu C nejsou ukazateli tkáňových koncentrací těchto antioxidantů. Zvýšení oxidačního stresu v aortě a myokardu u diabetických zvířat pravděpodobně není důsledkem nižších hladin tokoferolů, ale spíše souvisí s nedostatkem redukovaného glutationu, který hraje klíčovou roli v intracelulárních antioxidačních systémech.

5.1.6. Úloha oxidačního stresu při nealkoholické jaterní steatóze

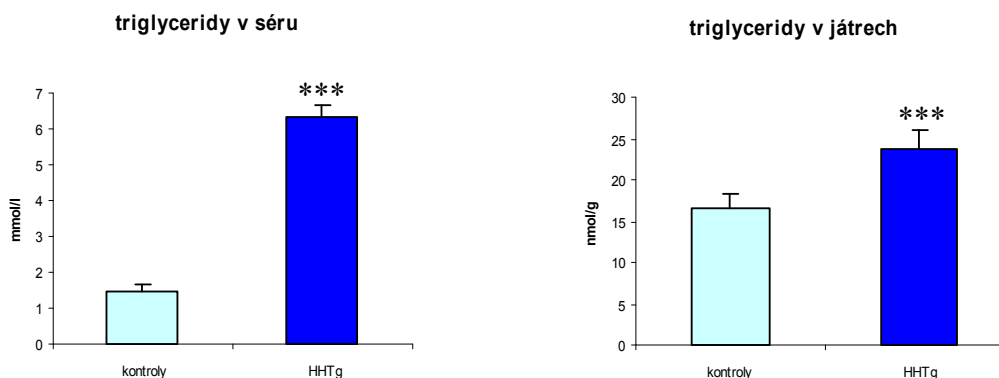
Nealkoholická jaterní steatóza je novou komponentou metabolického syndromu a její prevalence u osob s metabolickým syndromem může dosáhnout až 75% v přítomnosti obezity nebo diabetu 2. typu (Rector et al 2008). V rozvoji jaterní steatózy hraje důležitou roli genetická predispozice, nutriční faktory a jak naznačují recentní studie také oxidační stres. Oxidační stres je závažný vzhledem k jeho uplatnění v progresi jaterní steatózy do steatohepatitidy.

Cílem naší studie bylo sledování parametrů oxidačního stresu v játrech u experimentálních modelů metabolického syndromu s geneticky fixovanou hypertriglyceridémií a u transgenních zvířat s overexpresí transkripčního faktoru SREBP-1a, který se uplatňuje v regulaci lipidového metabolismu.

5.1.6.1. Oxidační stres v játrech u modelu metabolického syndromu s geneticky fixovanou hypertriglyceridémií

Výrazná akumulace triglyceridů v játrech u HHTg potkanů po podávání vysokosacharózové diety po dobu 2 měsíců (obrázek 13) vedla ke snížení redukované formy glutationu a zvýšení oxidované formy glutationu v játrech (tabulka 27). Zvýšení poměru oxidované/redukované formy glutationu je důležitým ukazatelem oxidačního stresu. Výrazně snížena byla rovněž aktivita SOD a katalázy v játrech. Akumulace triglyceridů v játrech u HHTg potkanů vedla k výraznému nárůstu lipoperoxičních produktů (tabulka 27).

Obrázek 13 – Koncentrace triglyceridů v séru a játrech u HHTg potkanů.
 Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (*t*-test).



Tabulka 27 – Parametry oxidačního stresu v játrech u HHTg potkanů po dlouhodobém podávání vysokosacharóзовé diety.

JÁTRA	kontroly	HHTg	P
GSH (mmol/mg protein)	5,03 ± 0,54	3,14 ± 0,39	< 0,05
GSSG (mmol/mg protein)	0,26 ± 0,07	0,48 ± 0,08	< 0,05
GSSG/GSH (%)	4,32 ± 0,92	13,66 ± 1,01	< 0,01
SOD (U/mg protein)	1,357 ± 0,107	0,507 ± 0,064	< 0,001
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	572 ± 54	433 ± 17	< 0,05
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	667 ± 24	671 ± 41	NS
TBARS (nmol/mg protein)	0,44 ± 0,08	1,11 ± 0,10	< 0,001
CD (nmol/mg protein)	20,45 ± 1,17	51,01 ± 3,08	< 0,001

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (6-10 zvířat ve skupině).

Kontroly – potkani kmene Wistar

HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani inzulino resistantní

Dieta – vysokosacharózová po dobu 2 měsíců

Stáří zvířat – 4 měsíce

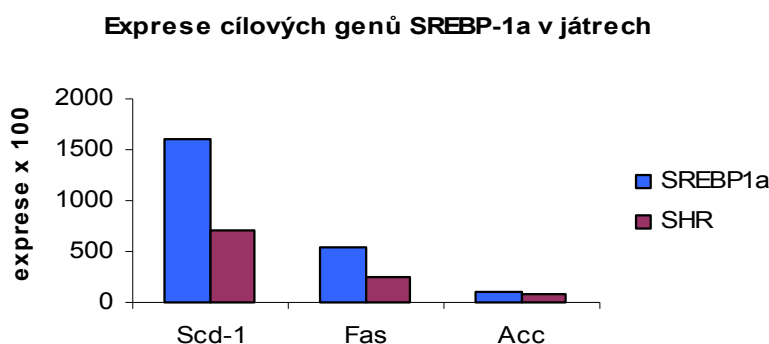
Závěr: Výsledky ukazují, že zvýšená akumulace triglyceridů v játrech byla spojena se sníženým obsahem redukováného glutationu, zatímco množství oxidované formy glutationu GSSG bylo zvýšeno. Výsledky podporují hypotézu, podle které hraje glutation klíčovou roli v mechanismu oxidačního stresu v rozvoji jaterní steatózy.

5.1.6.2. Vliv transgenní exprese SREBP-1a na oxidační stres

Zvýšená akumulace lipidů v játrech, která často doprovází metabolický syndrom, může negativně ovlivnit metabolické poruchy spojené s inzulinovou rezistencí a může progredovat v nealkoholickou steatohepatitidu. Patofyziologické mechanismy, které vedou k přechodu prosté steatózy k steatohepatitidě, nejsou známy. Podle hypotézy „dvou kroků“ se může v progresi jaterního poškození uplatnit oxidační stres. Sledovali jsme proto parametry oxidačního stresu u nového experimentálního modelu jaterní steatózy, u transgenních SREBP-1a potkanů. Transgenní spontánně hypertenzní potkani kmene SHR vykazují zvýšenou expresi dominantní pozitivní formy lidského SREBF1 genu (sterol regulatory element binding factor 1 kódující SREBP-1a izoformu) pod kontrolou PEPCK promotoru (Qi et al 2005). Tato transgenní zvířata jsou geneticky predisponovaná k akumulaci lipidů v játrech v důsledku zvýšené exprese genů Scd-1 a Fas, které regulují syntézu triglyceridů a cholesterolu v játrech (obrázek 14).

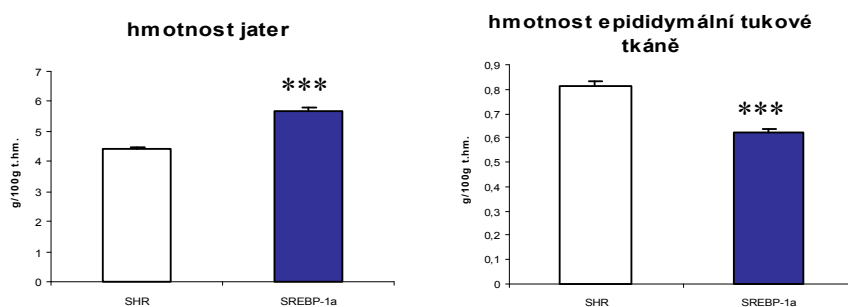
Obrázek 14 – exprese cílových genů v játrech (Qi et al 2005)

SCD – stearyl desaturáza, FAS – syntáza mastných kyselin, ACC – acetylCoA-karboxyláza



Obrázek 15 – Vliv exprese SREBP-1a na hmotnost jater a epididymálního tukového tělesa

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (*t*-test).



Transgenní exprese SREBP-1a mírně snížila tělesnou hmotnost zvířat (235 ± 8 vs 253 ± 3 g, $P < 0,05$) a vedla k výrazné akumulaci lipidů v játrech (obrázek 15).

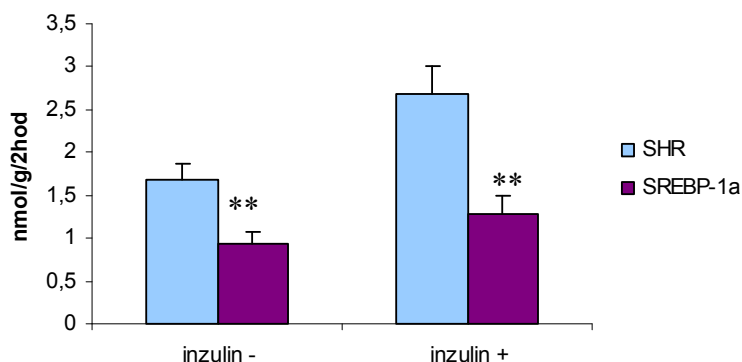
Transgenní exprese SREBP-1a v porovnání s kontrolními SHR potkany vedla k masivní jaterní steatóze a negativně ovlivnila parametry lipidového metabolismu i inzulínové rezistence (tabulka 28 a obrázek 16).

Tabulka 28 – Vliv transgenní exprese SREBP-1a na parametry lipidového metabolismu a inzulínové rezistence.

Parametr	SHR	SREBP-1a	P
glykémie, mmol/l	$5,2 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,1$	$< 0,01$
sérový inzulin, nmol/l	$1,1 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$< 0,01$
sérové triglyceridy, mmol/l	$1,9 \pm 0,03$	$6,5 \pm 0,5$	$< 0,001$
sérové NEMK, mmol/l	$0,4 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,04$	$< 0,001$
sérový cholesterol, mmol/l	$1,8 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$< 0,001$
OGTT – AUC mmol/2hod	813 ± 13	797 ± 7	N.S.
triglyceridy v játrech, $\mu\text{mol/g}$	$13,1 \pm 0,06$	$32,6 \pm 3,5$	$< 0,001$
cholesterol v játrech, $\mu\text{mol/g}$	$6,9 \pm 0,2$	$10,6 \pm 0,6$	$< 0,001$
triglyceridy v m. soleus, $\mu\text{mol/g}$	$4,9 \pm 0,5$	$9,2 \pm 1,2$	$< 0,001$

Hodnoty udávají průměr \pm SE, počet zvířat ve skupině 8-9.

Obrázek 16 – Vliv transgenní exprese SREBP-1a na utilizaci glukózy v kosterním svalu *m. soleus*. Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (*t*-test).



Expresa SREBP-1a zvýšila lipoperoxidaci v játrech, která byla spojena se sníženou aktivitou antioxidantních enzymů SOD a glutathionperoxidázy. Aktivita glutathionreduktázy ani katalázy v játrech nebyly změněny ve srovnání s kontrolní SHR skupinou (tabulka 29). Transgenní exprese SREBP-1a byla rovněž spojena se sníženou koncentrací glutathionu v játrech a výraznou deplecí α -tokoferolu/Tg a γ -tokoferolu/Tg v séru a aortě (tabulka 30).

Tabulka 29 – Vliv exprese SREBP-1a na parametry oxidačního stresu v játrech.

JÁTRA	SHR	SREBP1a	P
Tg (μmol/g)	13,1 ± 0,06	32,6 ± 3,5	< 0,001
GSH (mmol/mg protein)	1,38 ± 0,09	0,95 ± 0,07	< 0,05
SOD (U/mg protein)	0,329 ± 0,023	0,185 ± 0,022	< 0,05
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	475 ± 33	530 ± 44	NS
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	399 ± 47	248 ± 13	< 0,05
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	346 ± 18	329 ± 27	NS
TBARS (nmol/mg protein)	1,14 ± 0,05	1,41 ± 0,11	< 0,05
CD (nmol/mg protein)	22,44 ± 0,80	28,53 ± 1,75	< 0,05

Tabulka 30 – Vliv exprese SREBP-1a na parametry oxidačního stresu v aortě a myokardu.

SERUM / PLASMA	SHR	SREBP1a	P
Tg (mmol/l)	0,464 ± 0,030	5,600 ± 1,034	< 0,001
GSH (mmol/l)	2,24 ± 0,14	2,98 ± 0,18	< 0,05
αToc (μmol/l)	10,13 ± 0,62	35,73 ± 4,00	< 0,001
γToc (μmol/l)	0,225 ± 0,019	0,708 ± 0,059	< 0,001
αToc/Tg (μmol/mmol)	22,07 ± 0,98	6,75 ± 0,48	< 0,001
γToc/Tg (μmol/mmol)	0,485 ± 0,029	0,137 ± 0,014	< 0,001
AORTA	SHR	SREBP1a	P
Tg (μmol/g)	0,92 ± 0,21	2,01 ± 0,39	< 0,01
αToc (nmol/g)	46,12 ± 5,02	81,44 ± 11,21	< 0,01
γToc (nmol/g)	2,008 ± 0,231	2,999 ± 0,479	< 0,05
αToc/Tg (nmol/μmol)	63,72 ± 10,81	39,54 ± 10,99	NS
γToc/Tg (nmol/μmol)	2,74 ± 0,43	1,46 ± 0,42	NS
MYOKARD	SHR	SREBP1a	P
Tg (μmol/g)	2,06 ± 0,16	2,04 ± 0,85	NS
αToc (nmol/g)	49,98 ± 2,17	81,37 ± 2,98	< 0,001
γToc (nmol/g)	0,953 ± 0,043	1,380 ± 0,062	< 0,001
αToc/Tg (nmol/μmol)	26,353 ± 1,832	40,352 ± 2,384	< 0,001
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,502 ± 0,033	0,684 ± 0,043	< 0,01

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (8-9 zvířat ve skupině).

SHR – spontánně hypertenzní potkani

SREBP-1a – SHR potkani s overexpresí genu SREBP-1a

Dieta – vysokofruktózová (60% fruktózy) po dobu 2 týdnů

Stáří zvířat – 2 měsíce

Histologické vyšetření jater ukázalo, že chronická stimulace syntézy lipidů v játrech v kombinaci se zvýšením oxidačního stresu vedla u zvířat ve věku 10 týdnů k jaterní steatóze bez známek zánětu. Naproti tomu zvířata ve věku 16 měsíců vykazovala příznaky steatohepatitidy (obrázek 17).

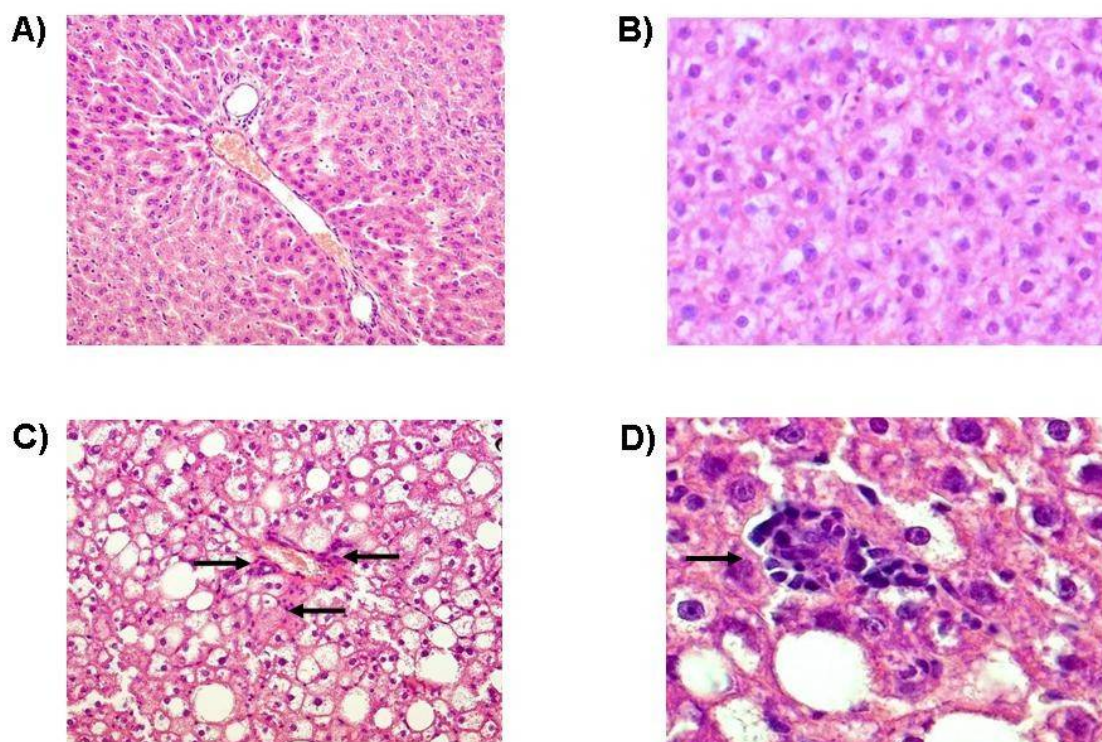
Obrázek 17 – histologické nálezy jaterní tkáně

A – SHR ve věku 16 měsíců, normální histologický nález jaterního parenchymu

B – SREBP-1a ve věku 2 měsíců, normální nález jaterní steatózy bez známek zánětu

C – SREBP-1a ve věku 16 měsíců, nápadné tukové změny a steatohepatitida

D – normální nález steatohepatitidy s lokální nekrózou a infiltrací zánětu



Závěr : Zvýšená exprese SREBP-1a byla u mladých zvířat spojena se zvýšením oxidačního stresu v játrech a výrazným snížením α - a γ -tokoferolu v séru. Zvýšení oxidačního stresu v játrech u mladých zvířat vedlo v pozdějším věku k rozvoji steatohepatitidy. Tyto výsledky naznačují možné uplatnění oxidačního stresu v rozvoji steatohepatitidy.

5.2. OVLIVNĚNÍ OXIDAČNÍHO STRESU NUTRIČNÍ A FARMAKOLOGICKOU INTERVENCÍ

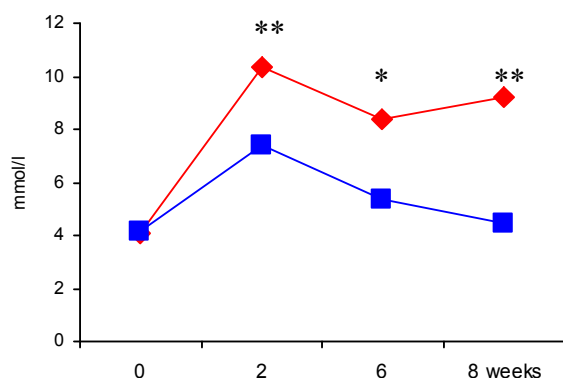
5.2.1. Účinky konjugované kyseliny linolové

CLA patří mezi polynenasycené mastné kyseliny řady n-6 a je obsažena v mase a mléce přežvýkavců. Vzhledem ke svým antiadipogenním, antiaterogenním a protizánětlivým účinkům je CLA doporučována jako potravinový doplněk na snížení tělesné hmotnosti. Výsledky klinických studií jsou však značně rozporuplné a nekonzistentní. Mechanismy jejího působení ani účinky u osob s metabolickým syndromem nejsou objasněny.

V naší studii jsme sledovali vliv CLA na parametry lipidového a sacharidového metabolismu, parametry inzulinové rezistence a oxidačního stresu ve tkáních u experimentálního modelu metabolického syndromu, u HHTg.

CLA byla podávána v dávce 2g/100g diety po dobu 2 měsíců přidáním do vysokosacharóзовé diety. Kontrolní skupině byl do vysokosacharóзовé diety přidán slunečnicový olej ve stejné koncentraci. Podání CLA neovlivnilo příjem potravy, snížilo tělesnou hmotnost (382 ± 8 g vs 422 ± 15 g, $p < 0,05$) a hmotnost viscerální tukové tkáně ($4,15 \pm 0,21$ g vs $3,55 \pm 0,25$ g/100g t.v., $p < 0,01$). Během 2 měsíčního podávání CLA chránilo před zvýšením hladin sérových triglyceridů podáním vysokosacharóзовé diety (obrázek 18). CLA měla rovněž příznivý vliv na hladinu krevních lipidů i glukózy a inzulinu (tabulka 31).

Obrázek 18 : Hladiny sérových triglyceridů během podávání CLA u HHTg potkanů po dobu dvou měsíců. *Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).*



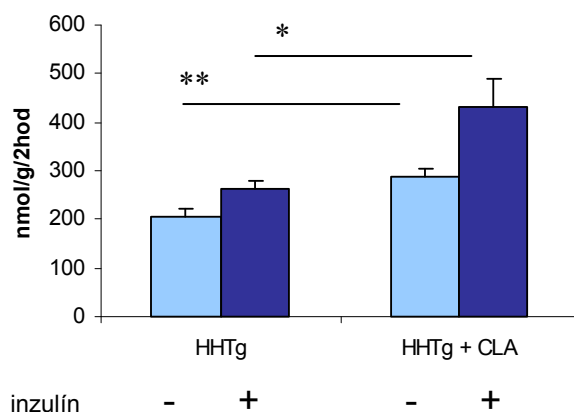
Tabulka 31 : Vliv podávání konjugované kyseliny linolové na parametry sacharidového a lipidového metabolismu u HHTg potkanů.

	HHTg	HHTg + CLA	P
triglyceridy (mmol/l)	5,01 ± 0,49	3,64 ± 0,50	< 0,05
cholesterol (mmol/l)	1,24 ± 0,08	0,96 ± 0,06	< 0,05
FFA (mmol/l)	1,25 ± 0,06	0,86 ± 0,05	< 0,001
HDL-C (mmol/l)	1,42 ± 0,06	1,38 ± 0,13	N.S.
glukoza (mmol/l)	7,0 ± 0,4	5,6 ± 0,4	< 0,05
inzulin (nmol/l)	0,178 ± 0,013	0,105 ± 0,011	< 0,05

CLA v tukové tkáni zvýšila senzitivitu k účinku inzulinu (obrázek 19), zatímco senzitivita v kosterním svalu nebyla ovlivněna. V mechanismu účinku CLA se může uplatnit zvýšená lipolýza mastných kyselin ($2,68 \pm 0,15$ nmol/g/2hod vs $2,15 \pm 0,18$ nmol/g/2 hod, $p < 0,05$), která byla spojena s jejich zvýšenou oxidací v kosterním svalu (151 ± 7 nmol/g/2hod vs 124 ± 5 nmol/palmitátu/g/2hod, $p < 0,01$) a sníženou koncentrací triglyceridů. Podávání CLA nevedlo k ektopickému ukládání triglyceridů, neboť jejich koncentrace byla ve všech sledovaných tkáních snížena (tabulka 38). Podávání CLA stimulovalo sekreci adiponektinu ($7,48 \pm 0,38$ vs $6,10 \pm 0,33$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$), který příznivě působí na inzulinovou senzitivitu. Příznivé ovlivnění hladin krevních lipidů nebylo spojeno se zlepšením oxidačního stresu v myokardu (tabulka 33). Podávání CLA naopak zlepšilo parametry oxidačního stresu v játrech, kde byla snížena hladina oxidované formy glutationu (tabulka 32), zvýšeny aktivity glutationperoxidázy a glutationreduktázy a snížena tvorba lipoperoxidačních produktů.

Obrázek 19 : Vliv CLA na senzitivitu tukové tkáně k účinku inzulinu

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).



Tabulka 32: Vliv podávání konjugované kyseliny linolové na tkáňové koncentrace triglyceridů.

triglyceridy (μmol/g)	HHTg	HHTg + CLA	P
sval gastrocnemius	10,82 ± 0,70	8,03 ± 0,64	< 0,01
myokard	1,59 ± 0,13	0,99 ± 0,12	< 0,01
aorta	2,81 ± 0,31	1,97 ± 0,15	< 0,05
játra	19,18 ± 1,73	12,31 ± 0,89	< 0,01

Tabulka 33: Vliv podávání konjugované kyseliny linolové na parametry oxidačního stresu v játrech a na jaterní enzymy v séru.

JÁTRA	HHTg	HHTg + CLA	P
ALT (μcat/l)	1,06 ± 0,06	1,29 ± 0,08	N.S.
AST (μcat/l)	4,32 ± 0,23	4,48 ± 0,17	N.S.
GSH (μmol/ mg protein)	6,99 ± 0,06	6,37 ± 0,05	N.S.
GSSG (μmol/ mg protein)	0,92 ± 0,06	0,57 ± 0,06	< 0,05
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	428 ± 16	512 ± 19	< 0,01
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	238 ± 44	334 ± 23	< 0,01
SOD (U/mg protein)	0,477 ± 0,030	0,496 ± 0,024	N.S.
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	688 ± 39	658 ± 44	N.S.
TBARS (nmol/mg protein)	0,985 ± 0,071	0,794 ± 0,044	< 0,05

Tabulka 34: Vliv podávání konjugované kyseliny linolové na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	HHTg	HHTg + CLA	P
α-tokoferol/ TG (nmol/μmol)	61,68 ± 4,92	76,36 ± 7,89	N.S.
γ-tokoferol/ TG (nmol/μmol)	0,64 ± 0,06	0,55 ± 0,06	N.S.
GSH (μmol/ mg protein)	2,07 ± 0,13	1,80 ± 0,09	N.S.
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	566 ± 15	628 ± 16	< 0,05
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	177 ± 7	180 ± 13	N.S.
SOD (U/mg protein)	0,836 ± 0,056	0,716 ± 0,044	N.S.
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	640 ± 27	658 ± 44	N.S.
TBARS (nmol/mg protein)	1,159 ± 0,086	1,023 ± 0,040	N.S.

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (8 zvířat ve skupině).

HHTg – HHTg potkani

HHTg + CLA – HHTg potkani po podání CLA.v dávce 2 mg/100g diety. po dobu 8 týdnů

Dieta – vysokosacharózová

Stáří zvířat – 6 měsíců

Závěr: Podávání CLA u experimentálního modelu metabolického syndromu snížilo tělesnou hmotnost i množství viscerální tukové tkáně, zlepšilo parametry lipidového i sacharidového metabolismu a stimulovalo sekreci adiponektinu. V tukové tkáni podávání CLA zlepšilo senzitivitu k účinku inzulinu a zvýšilo lipolýzu mastných kyselin, která nebyla spojena s nežádoucím ektopickým ukládáním triglyceridů. CLA snížila rovněž oxidační stres v játrech. Výsledky podporují hypotézu o příznivých účincích CLA při metabolickém syndromu.

5.2.2. Antioxidační účinky vitamínu E

Klíčovou úlohu v rozvoji kardiovaskulárního poškození hraje oxidační stres v arteriální stěně, který může být důsledkem nižší koncentrace antioxidantů. Dosud je jen málo údajů o hladinách α - a γ -tokoferolu v cévní stěně a o jejich možném ovlivnění podáváním vitamínu E. V naší studii jsme sledovali koncentrace α - a především γ -tokoferolu v intimně-medii a v myokardu při zvýšeném příjmu α -tokoferolu u kontrolních zvířat a u experimentálního modelu metabolického syndromu. α -Tokoferol byl podáván ve formě α -tokoferol acetátu v dávce 500 mg/ kg diety po dobu 3 týdnů.

Podávání vitamínu E neovlivnilo tělesnou váhu zvířat (244 ± 4 vs 239 ± 5 g), sérové koncentrace glukózy, triglyceridů ani NEMK. Podávání α -tokoferol-acetátu výrazně zvýšilo koncentraci α -tokoferolu v séru i v aortě a myokardu (tabulky 35, 36 a 37), ale neovlivnilo koncentraci γ -tokoferolu v aortě u kontrolních zvířat kmene Wistar ani u HHTg potkanů (tabulka 36). Podávání vitamínu E výrazně snížilo parametry lipoperoxidace v séru i v myokardu a zvýšilo hladinu glutationu v séru. Aktivita antioxidačních enzymů nebyly podáváním vitamínu E ovlivněny.

Tabulka 35 – Vliv podávání vitamínu E na parametry oxidačního stresu v séru / plasmě.

SERUM / PLASMA	kontroly	kontroly + VE	P
Tg (mmol/l)	2,297 ± 0,190	2,643 ± 0,223	NS
GSH (mmol/l)	2,49 ± 0,22	3,10 ± 0,14	< 0,05
αToc (μmol/l)	23,79 ± 1,04	67,35 ± 2,59	< 0,001
γToc (μmol/l)	0,232 ± 0,017	0,620 ± 0,029	< 0,001
αToc/Tg (μmol/mmol)	10,74 ± 0,75	26,64 ± 2,15	< 0,001
γToc/Tg (μmol/mmol)	0,103 ± 0,006	0,246 ± 0,022	< 0,001
SOD (U/ml)	1,207 ± 0,163	0,825 ± 0,099	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/ml)	756 ± 16	706 ± 27	NS
GPx (μmol GSH/min/ml)	243 ± 18	283 ± 16	NS
TBARS (nmol/l)	0,726 ± 0,053	0,518 ± 0,053	< 0,01
CD (nmol/l)	32,33 ± 1,29	21,15 ± 1,53	< 0,001

Tabulka 36 – Vliv podávání vitamínu E na parametry oxidačního stresu v aortě.

AORTA	kontroly	kontroly + VE	P
Tg (μmol/g)	4,49 ± 0,33	5,32 ± 0,48	NS
αToc (nmol/g)	53,10 ± 4,17	137,44 ± 11,49	< 0,001
γToc (nmol/g)	1,660 ± 0,261	1,593 ± 3,047	NS
αToc/Tg (nmol/μmol)	12,28 ± 1,31	27,45 ± 2,79	< 0,01
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,384 ± 0,062	0,511 ± 0,083	NS

	HHTg	HHTg + VE	P
Tg (μmol/g)	5,03 ± 0,49	4,08 ± 0,33	NS
αToc (nmol/g)	29,77 ± 3,20	43,14 ± 2,48	< 0,01
γToc (nmol/g)	0,671 ± 0,109	0,898 ± 0,104	NS
αToc/Tg (nmol/μmol)	6,314 ± 1,067	11,061 ± 1,029	< 0,05
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,166 ± 0,041	0,226 ± 0,022	NS

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (8 zvířat ve skupině).

kontroly – potkani kmene Wistar

kontroly + VE – kontrolní potkani po podání α-tokoferol acetátu v dávce 500 mg/kg diety. po dobu 3 týdny

HHTg – HHTg potkani

HHTg + VE – kontrolní potkani po podání α-tokoferol acetátu v dávce 500 mg/kg diety. po dobu 3 týdny

Dieta – vysokosacharózová

Stáří zvířat – 6-8 měsíců

Tabulka 37 – Vliv podávání vitamínu E na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	kontroly	kontroly + VE	P
Tg (μmol/g)	3,01 ± 0,30	3,38 ± 0,28	NS
GSH (mmol/mg protein)	2,65 ± 0,24	2,66 ± 0,19	NS
αToc (nmol/g)	89,36 ± 7,32	177,13 ± 6,96	< 0,001
γToc (nmol/g)	0,666 ± 0,068	1,363 ± 0,058	< 0,001
αToc/Tg (nmol/μmol)	27,99 ± 3,17	54,91 ± 4,96	< 0,001
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,205 ± 0,022	0,421 ± 0,034	< 0,001
SOD (U/mg protein)	0,851 ± 0,029	1,109 ± 0,111	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	359 ± 16	362 ± 13	NS
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	730 ± 22	815 ± 22	NS
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	90 ± 6	107 ± 12	NS
TBARS (nmol/mg protein)	0,956 ± 0,084	0,660 ± 0,083	< 0,05
CD (nmol/mg protein)	15,925 ± 1,031	10,914 ± 1,086	< 0,01

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (8 zvířat ve skupině).

kontroly – potkani kmene Wistar

kontroly + VE – kontrolní potkani po podání α-tokoferol acetátu .v dávce 500 mg/kg diety. po dobu 3 týdny

Dieta – vysokosacharózová

Stáří zvířat – 6-8 měsíců

Závěr : Výsledky ukazují, že lze podáváním α-tokoferolu zvýšit koncentrace tohoto antioxidantu v intimně-medii a v myokardu, tedy v místech, kde oxidační stres může vyvolat kardiovaskulární poškození. Podávání α-tokoferolu nesnížilo koncentrace γ-tokoferolu. Distribuce mezi α- a γ-tokoferolem tedy neprobíhá na bázi kompetice mezi oběma izoformami vitamínu E. Podávání α-tokoferolu neovlivnilo parametry sacharidového metabolismu.

Podávání vitamínu E snížilo lipoperoxidaci v séru i v myokardu, ale neovlivnilo ostatní složky antioxidantního systému.

5.2.3. Metabolické účinky glutationu

Klíčovou komponentou antioxidačního systému je glutationový redoxní systém. Glutathion je tripeptid, který je z 90% syntetizován v játrech enzymy glutamylcysteinsyntázou a glutathionsyntázou. Pokles hladin glutathionu patří k typickým příznakům oxidačního stresu. Většina glutathionu v buňkách se nachází v redukované formě, méně než 5% z celkového množství glutathionu tvoří jeho oxidovaná forma. Poměr GSH/GSSG je důležitým ukazatelem redox stavu buňky. V klinických studiích je glutathion používán k léčení komplikací diabetu nebo následků deficitů proteinu v potravě. Některé studie naznačily, že oxidační stres může inhibovat inzulinem stimulovaný transport do adipocytů a buněk kosterního svalů a tím ovlivnit senzitivitu tkání k účinku inzulinu (Tirosh et al 1999). Jedná se však o in vitro studie na izolovaných buňkách.

Nevýhodou při terapii je krátký poločas podávaného glutathionu v organismu a jeho nízký transport do buněk. Recentní experimentální studie naznačují, že estery glutathionu, které působí jako prekursory glutathionu, tyto nevýhody nemají, lépe přechází přes buněčné membrány a v buňce jsou hydrolyzovány zpět na GSH. Naopak k depleci glutathionu vedlo podávání BSO (buthionine sulfoximine, Sigma), který je inhibitorem glutathionsyntázy.

V naší studii jsme sledovali vliv glutathionu na jednotlivé parametry oxidačního stresu a jeho vliv na sacharidový a lipidový metabolismus.

5.2.3.1. Vliv podání glutathionu ethyl esterů na parametry oxidačního stresu

Glutathion byl podáván ve formě glutathionu ethyl esterů (GEE, Sigma) intraperitoneálním podáním 2x denně v dávce 30mmol/kg/den po dobu 4 dnů. Podávání GEE neovlivnilo tělesnou váhu zvířat (403 ± 17 vs 415 ± 21 g). Podávání GEE výrazně zvýšilo koncentraci glutathionu v séru, myokardu i játrech ($3,53 \pm 0,29$ vs $1,15 \pm 0,26$ mmol/mg protein, $p < 0,001$) a rovněž snížilo lipoperoxidaci v séru i myokardu (tabulky 38 a 39). Zvýšení hladin glutathionu po podání GEE bylo spojeno se zvýšením aktivit glutathion-dependentních antioxidačních enzymů a v myokardu rovněž se zvýšením SOD a katalázy. Koncentrace α - a γ -tokoferolu v myokardu nebyly podáváním GEE ovlivněny. Podávání GEE snížilo koncentraci triglyceridů v séru, neovlivnilo však glykémii ani inzulin, nezlepšilo senzitivitu tukové ani svalové tkáně k účinku inzulinu.

Tabulka 38 – Vliv podávání glutathione ethyl esterů na parametry oxidačního stresu v seru / plasmě.

SERUM / PLASMA	HHTg	HHTg + GEE	P
Tg (mmol/l)	4,22 ± 0,72	2,25 ± 0,16	< 0,05
GSH (mmol/l)	1,07 ± 0,04	4,65 ± 0,15	< 0,001
αToc (μmol/l)	11,27 ± 1,06	9,60 ± 0,43	NS
γToc (μmol/l)	0,243 ± 0,029	0,169 ± 0,006	< 0,05
αToc/Tg (μmol/mmol)	2,91 ± 0,30	4,25 ± 0,29	< 0,01
γToc/Tg (μmol/mmol)	0,062 ± 0,006	0,075 ± 0,005	NS
AA (μmol/l)	29,04 ± 1,99	35,69 ± 2,10	< 0,05
SOD (U/ml)	0,704 ± 0,104	1,049 ± 0,136	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/ml)	390 ± 47	364 ± 44	NS
GPx (μmol GSH/min/ml)	187 ± 32	469 ± 24	< 0,001
GR (μmol NADPH/min/ml)	274 ± 21	66 ± 8	< 0,001
TBARS (nmol/l)	3,24 ± 0,14	2,78 ± 0,21	< 0,05
CD (nmol/l)	32,70 ± 0,64	23,78 ± 0,82	< 0,01

Tabulka 39 – Vliv podávání glutathione ethyl esterů na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	HHTg	HHTg + GEE	P
GSH (mmol/mg protein)	1,44 ± 0,12	2,13 ± 0,12	< 0,01
αToc (nmol/g)	60,27 ± 2,82	61,48 ± 3,02	NS
γToc (nmol/g)	0,862 ± 0,043	0,807 ± 0,047	NS
SOD (U/mg protein)	0,745 ± 0,079	0,465 ± 0,052	< 0,001
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	291 ± 11	358 ± 5	< 0,001
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	342 ± 43	572 ± 9	< 0,001
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	214 ± 28	72 ± 11	< 0,001
TBARS (nmol/mg protein)	2,357 ± 0,201	1,028 ± 0,061	< 0,001
CD (nmol/mg protein)	24,32 ± 1,57	19,48 ± 0,74	< 0,05

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (5-7 zvířat ve skupině).

HHTg – HHTg potkani

HHTg + GEE – HHTg potkani po podání GEE i.p.v dávce 30 mg/kg t.hm. 2x denně po dobu 4 dnů

Dieta – vysokosacharózová

Stáří zvířat – 16 měsíců

Závěr : Podání prekursoru glutationu zvýšilo nejen hladinu glutationu ale příznivě ovlivnilo další složky antioxidačního systému a snížilo lipoperoxidaci a tím může příznivě ovlivnit oxidační stres spojený s metabolickým syndromem. Podávání prekursoru glutationu nezlepšilo parametry sacharidového metabolismu ani senzitivitu tkání k účinku inzulinu.

5.2.3.2. Vliv deplece glutationu na parametry oxidačního stresu

Deplece glutationu byla vyvolána podáním BSO (buthione sulfoximine) v dávce 30mmol/l v pitné vodě po dobu 1 týdne. Podávání BSO neovlivnilo tělesnou váhu zvířat (410 ± 18 vs 415 ± 21 g). Podávání BSO výrazně snížilo hladiny glutationu v séru, myokardu i játrech ($0,53 \pm 0,05$ vs $1,15 \pm 0,03$ mmol/mg protein, $P < 0,001$). Dále bylo podávání BSO spojeno s výrazným snížením koncentrace triglyceridů v séru (tabulka 40). Na druhou stranu hypolipidemický účinek podávání BSO byl spojen se zvýšením lipoperoxidace v séru, v myokardu nebyla produkce lipoperoxidačních produktů ovlivněna. Deplece glutationu v séru snížila hladiny kyseliny askorbové a zvýšila aktivitu glutationreduktázy. Snížené hladiny glutationu v myokardu byly rovněž spojeny se zvýšenou aktivitou glutationreduktázy a dále se sníženou aktivitou glutationperoxidázy a se zvýšenou aktivitou katalázy (tabulky 41 a 42). Podávání BSO snížilo hladinu cGMP v aortě ($47,45 \pm 1,35$ vs $54,29 \pm 2,76$ pmol/l, $p < 0,05$), který se uplatňuje při vazodilataci.

Deplece glutationu neovlivnila glykémii ($4,7 \pm 0,1$ vs $4,56 \pm 0,2$ mmol/l) ani sérový inzulin ($0,536 \pm 0,14$ vs $0,455 \pm 0,144$ nmol/l), ale zhoršila glykémii během OGTT (tabulka 40). Dále vedla deplece glutationu ke zhoršení senzitivity tukové tkáně k účinku inzulinu (obrázek 20), senzitivita svalové tkáně nebyla ovlivněna.

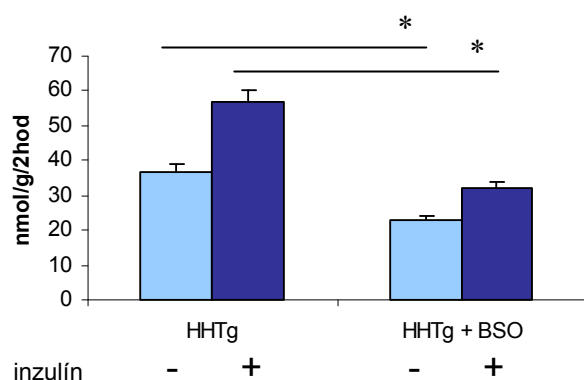
Tabulka 40 – Parametry lipidového a sacharidového metabolismu

Parametr	HHTg	HHTg + BSO	P
epididymal. tuk. tkáň, g/100g	$1,95 \pm 0,18$	$1,86 \pm 0,12$	N.S.
sérové triglyceridy, mmol/l	$4,22 \pm 0,72$	$1,90 \pm 0,42$	$< 0,02$
glykémie, mmol/l	$4,6 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,1$	N.S.
sérový inzulin, nmol/l	$0,46 \pm 0,14$	$0,54 \pm 0,14$	N.S.
OGTT – AUC mmol/2hod	778 ± 119	918 ± 24	$< 0,02$

Hodnoty udávají průměr \pm SE, počet zvířat ve skupině 7.

Obrázek 20 – Vliv deplece glutationu na senzitivitu tukové tkáně k účinku inzulinu

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (t-test).



Tabulka 41 – Vliv deplece glutationu podáváním BSO na parametry oxidačního stresu v séru / plazmě.

SERUM / PLASMA	HHTg	HHTg + BSO	P
Tg (mmol/l)	4,22 ± 0,72	1,79 ± 0,42	< 0,01
GSH (mmol/l)	1,07 ± 0,04	0,37 ± 0,02	< 0,001
αToc (μmol/l)	11,27 ± 1,06	8,85 ± 1,43	NS
γToc (μmol/l)	0,243 ± 0,029	0,185 ± 0,020	NS
αToc/Tg (μmol/mmol)	2,91 ± 0,30	4,26 ± 0,75	NS
γToc/Tg (μmol/mmol)	0,062 ± 0,006	0,126 ± 0,030	< 0,05
AA (μmol/l)	29,04 ± 1,99	21,82 ± 2,01	< 0,05
SOD (U/ml)	0,704 ± 0,104	0,780 ± 0,104	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	390 ± 47	379 ± 54	NS
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	187 ± 32	162 ± 24	NS
GR (μmol NADPH/min/ml)	274 ± 21	437 ± 31	< 0,01
TBARS (nmol/l)	3,24 ± 0,14	4,30 ± 0,22	< 0,01
CD (nmol/l)	32,70 ± 0,64	46,65 ± 1,21	< 0,001

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (7 zvířat ve skupině).

HHTg – HHTg potkani

HHTg + BSO – HHTg potkani po podání BSO v dávce 30 mmol/l pitné vody po dobu 1 týdne

Dieta – vysokosacharózová

Stáří zvířat – 16 měsíců

Tabulka 42 – Vliv deplece glutationu podáváním BSO na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	HHTg	HHTg + BSO	P
GSH (mmol/mg protein)	1,44 ± 0,12	0,44 ± 0,03	< 0,001
αToc (nmol/g)	60,27 ± 2,82	70,33 ± 6,04	NS
γToc (nmol/g)	0,862 ± 0,043	0,827 ± 0,056	NS
SOD (U/mg protein)	0,745 ± 0,079	0,630 ± 0,091	NS
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	291 ± 11	500 ± 25	< 0,001
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	342 ± 43	213 ± 19	< 0,05
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	214 ± 28	359 ± 36	< 0,05
TBARS (nmol/mg protein)	2,357 ± 0,201	2,319 ± 0,183	NS
CD (nmol/mg protein)	24,32 ± 1,57	22,51 ± 1,23	NS

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (7 zvířat ve skupině).

HHTg – HHTg potkani

HHTg + BSO – HHTg potkani po podání BSO v dávce 30 mmol/l pitné vody po dobu 1 týdne

Dieta – vysokosacharózová

Stáří zvířat – 16 měsíců

Závěr : Deplece glutathionu vyvolaná podání inhibitoru glutathionsyntázy nejen zvyšovalo oxidační stres ale také významně zhoršovalo glukózovou toleranci a senzitivitu tukové tkáně k účinku inzulinu u experimentálního modelu metabolického syndromu. Naše výsledky podporují hypotézu, podle které oxidační stres může potencovat metabolické změny spojené s inzulinovou rezistencí a metabolickým syndromem.

5.2.4. Metabolické účinky kyseliny lipoové

Kyselina lipoová hraje důležitou roli v energetickém metabolismu (je kofaktorem pyruvátdehydrogenázy, α -ketoglutarátdehydrogenázy, působí při oxidační dekarboxylaci pyruvátu). α -LA i její redukční forma kyselina dihydrolipoová (DHLA) jsou silné multifunkční antioxidanty. Možné terapeutické využití LA se zaměřilo na snížení kardiovaskulárního rizika pro svůj pozitivní vliv na oxidabilitu LDL, hladinu krevních lipidů a hypertenzi a ovlivnění polyneuropatií u diabetiků. Mechanismus příznivého účinku LA nebyl dosud uspokojivě vysvětlen.

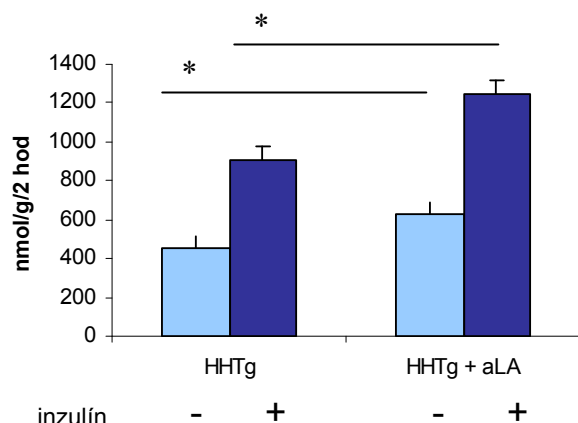
V naší studii jsme se proto zaměřili na sledování vlivu LA na parametry oxidačního stresu ve vztahu k parametrům lipidového a sacharidového metabolismu u experimentálního modelu metabolického syndromu.

Kyselina lipoová byla zvířatům podávána intragasticky sondou v dávce 30 mg/kg/den po dobu 2 týdnů. Kontrolní skupině zvířat byl podáván arašídový olej ve stejné dávce. Podávání α LA neovlivnilo tělesnou váhu zvířat (341 ± 13 vs 361 ± 10 g), sérové hladiny triglyceridů ($3,8 \pm 0,4$ vs $4,1 \pm 0,3$ mmol/l), cholesterolu ($2,2 \pm 0,1$ vs $2,4 \pm 0,1$ mmol/l), NEMK ($1,82 \pm 0,08$ vs $1,72 \pm 0,09$ mmol/l), glukózy ($5,67 \pm 0,17$ vs $5,74 \pm 0,15$ mmol/l), inzulinu ($0,37 \pm 0,02$ vs $0,41 \pm 0,03$ nmol/l), glykémii sledovanou během OGTT ani senzitivitu tukové tkáně k účinku inzulinu. Koncentrace α - a γ -tokoferolu v séru ani v myokardu nebyly podáváním α LA ovlivněny (tabulky 43 a 44). V séru i myokardu však podávání α LA zvýšilo hladinu glutationu a aktivity glutation-dependentních enzymů i SOD a snížilo parametry lipoperoxidace. Naproti tomu v kosterním svalu α LA snížila koncentraci triglyceridů ($2,08 \pm 0,18$ vs $2,76 \pm 0,24$ μ mol/g $p < 0,05$) a zvýšila bazální (627 ± 64 vs 453 ± 61 nmol/g/2h $p < 0,05$) i inzulinem stimulovanou (1241 ± 118 vs 906 ± 94 nmol/g/2h $p < 0,05$) inkorporaci glukózy do glykogenu a oxidaci glukózy (120 ± 12 vs 75 ± 10 nmol/g/2h $p < 0,05$). Výsledky naznačují, že zvýšení senzitivity bylo důsledkem snížené koncentrace triglyceridů a zvýšené oxidace glukózy ve svalu (obrázek 21).

Podávání α LA v játrech zvýšilo hladinu glutationu ($2,74 \pm 0,30$ vs $1,22 \pm 0,14$ mmol/mg protein $p < 0,001$) a snížilo parametry lipoperoxidace ($CD\ 39,25 \pm 5,39$ vs $54,34 \pm 3,96$ nmol/mg protein $p < 0,05$). Koncentrace triglyceridů v játrech nebyla podáváním kyseliny lipoové signifikantně ovlivněna.

Obrázek 21 – Vliv podávání kyseliny lipoové na senzitivitu svalové tkáně k účinku inzulinu

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroly (*t-test*).



Tabulka 43 – Vliv podávání kyseliny lipoové (α LA) na parametry oxidačního stresu v séru / plazmě.

SERUM / PLASMA	HHTg	HHTg + α LA	P
Tg (mmol/l)	3,82 \pm 0,35	4,11 \pm 0,28	NS
GSH (mmol/l)	2,24 \pm 0,14	2,98 \pm 0,18	< 0,01
αToc (μ mol/l)	16,33 \pm 1,05	17,18 \pm 0,45	NS
γToc (μ mol/l)	0,323 \pm 0,020	0,347 \pm 0,022	NS
αToc/Tg (μ mol/mmol)	4,46 \pm 0,35	4,46 \pm 0,30	NS
γToc/Tg (μ mol/mmol)	0,089 \pm 0,009	0,089 \pm 0,004	NS
SOD (U/ml)	2,272 \pm 0,194	3,782 \pm 0,231	< 0,001
CAT (μ mol H ₂ O ₂ /min/ml)	511 \pm 20	518 \pm 28	NS
GPx (μ mol GSH/min/ml)	422 \pm 26	544 \pm 27	< 0,01
GR (μ mol NADPH/min/ml)	302 \pm 25	340 \pm 42	NS
TBARS (nmol/l)	2,007 \pm 0,143	1,244 \pm 0,102	< 0,001
CD (nmol/l)	38,89 \pm 1,84	24,16 \pm 2,97	< 0,001

Data jsou uváděna jako průměry \pm SEM (5-7 zvířat ve skupině).

HHTg – HHTg potkání

HHTg + α LA – HHTg potkání po podání kyseliny lipoové sondou v dávce 30 mg/kg/den po dobu 2 týdnů

Dieta – vysokosacharózová + arašídový olej

Stáří zvířat – 6 měsíců

Tabulka 44 – Vliv podávání kyseliny lipoové na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	HHTg	HHTg + α LA	P
Tg (μ mol/g)	3,72 \pm 0,31	3,95 \pm 0,25	NS
GSH (mmol/mg protein)	3,35 \pm 0,38	5,23 \pm 0,70	< 0,05
αToc (nmol/g)	66,19 \pm 7,35	79,12 \pm 5,90	NS
γToc (nmol/g)	0,841 \pm 0,088	0,989 \pm 0,075	NS
αToc/Tg (nmol/ μ mol)	18,28 \pm 2,39	20,88 \pm 2,01	NS
γToc/Tg (nmol/ μ mol)	0,229 \pm 0,023	0,259 \pm 0,025	NS
SOD (U/mg protein)	0,615 \pm 0,065	0,670 \pm 0,076	NS
CAT (μ mol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	430 \pm 13	403 \pm 5	NS
GPx (μ mol GSH/min/mg protein)	484 \pm 37	613 \pm 27	< 0,01
GR (μ mol NADPH/min/mg protein)	132 \pm 16	63 \pm 7	< 0,001
TBARS (nmol/mg protein)	1,333 \pm 0,083	1,040 \pm 0,082	< 0,05
CD (nmol/mg protein)	21,01 \pm 1,84	16,46 \pm 1,88	NS

Data jsou uváděna jako průměry \pm SEM (5-7 zvířat ve skupině).

HHTg – HHTg potkani

HHTg + α LA – HHTg potkani po podání kyseliny lipoové sondou v dávce 30 mg/kg/den po dobu 2 týdnů

Dieta – vysokosacharózová + arašídový olej

Stáří zvířat – 6 měsíců

Tabulka 45 – Vliv podávání kyseliny lipoové na parametry oxidačního stresu v játrech.

JÁTRA	HHTg	HHTg + α LA	P
GSH (mmol/mg protein)	1,22 \pm 0,14	2,74 \pm 0,30	< 0,001
SOD (U/mg protein)	0,56 \pm 0,05	0,87 \pm 0,09	< 0,01
CAT (μ mol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	628 \pm 29	470 \pm 26	< 0,001
GPx (μ mol GSH/min/mg protein)	581 \pm 26	634 \pm 30	NS
GR (μ mol NADPH/min/mg protein)	476 \pm 23	295 \pm 24	< 0,001
TBARS (nmol/mg protein)	1,38 \pm 0,13	1,07 \pm 0,12	NS
CD (nmol/mg protein)	54,34 \pm 3,96	39,25 \pm 5,39	< 0,05

Data jsou uváděna jako průměry \pm SEM (5-7 zvířat ve skupině).

HHTg – HHTg potkani

HHTg + α LA – HHTg potkani po podání kyseliny lipoové sondou v dávce 30 mg/kg/den po dobu 2 týdnů

Dieta – vysokosacharózová + arašídový olej

Stáří zvířat – 6 měsíců

Závěr : Podávání α LA zvýšilo koncentraci glutationu a aktivitu glutation-dependentních enzymů a SOD a snížilo parametry lipoperoxidace v séru i tkáních. Hladiny α - a γ -tokoferolu v séru ani v myokardu však nebyly podáváním α LA ovlivněny. V kosterním svalu α LA snížila koncentraci triglyceridů a zlepšila senzitivitu k účinku inzulínu a oxidační využití glukózy. Výsledky naznačují pozitivní účinky podávání LA u poruch spojených s oxidačním stresem a metabolickým syndromem.

5.2.5. Vliv hypolipidemické terapie na oxidační stres a inzulínovou rezistenci

Fibráty, mezi které patří také gemfibrozil, jsou agonisté PPAR α , které se používají při léčbě dyslipidemií. Tyto látky účinně ovlivňují především hypertriglyceridémii, nízkou koncentraci HDL-cholesterolu a příznivě ovlivňují hladiny LDL-cholesterolu ([Fruchart 2001](#)). Recentní studie naznačují, že fibráty mohou mít pleiotropní efekt. Vedle výrazného hypolipidemického účinku mohou mít i antiaterogenní efekt nezávislý na jejich vlivu na lipidový metabolismus. Mechanismus tohoto účinku není objasněn, ale jedním z možných vlivů by mohl být příznivý účinek na oxidační stres ([Ceriello 2006](#)). V současné době chybí poznatky o účinku fibrátů na oxidační stres spojený s metabolickým syndromem a inzulínovou rezistencí.

Sledovali jsme proto v naší studii vliv gemfibrozilu na parametry oxidačního stresu v myokardu a játrech u experimentálního modelu metabolického syndromu.

Gemfibrozil byl podáván v dávce 0,1% po dobu 3 týdnů. Podávání gemfibrozilu neovlivnilo tělesnou váhu zvířat (443 ± 13 vs 449 ± 7 g). Podávání gemfibrozilu výrazně snížilo hladiny triglyceridů v séru a játrech zvýšené podáváním diety s vysokým podílem sacharózy. Hodnoty glykémie nalačno ani glykémie během OGTT nebyly podáváním gemfibrozilu ovlivněny (tabulka 46). Hypolipidemický účinek gemfibrozilu byl spojen se snížením produktů lipoperoxidace v séru, i myokardu a mírně v játrech. Podávání gemfibrozilu zvýšilo aktivitu antioxidačních enzymů v séru i v myokardu, naproti tomu snížené koncentrace glutationu, α - a γ -tokoferolu v myokardu nebyly podáváním gemfibrozilu ovlivněny (tabulky 47 a 48). V myokardu došlo působením gemfibrozilu k signifikantnímu zvýšení aktivit SOD a katalázy. Hladiny glutationu spolu s aktivitami SOD a katalázy byly zvýšeny v játrech po podání

gemfibrozilu (tabulka 49). Hypolipidemický účinek gemfibrozilu nebyl spojen se zlepšením senzitivity tukové ani svalové tkáně ani s lepším oxidačním využitím glukózy ve svalu ale došlo ke snížení hmotnosti epididymálního tukového tělesa jako ukazatele viscerální tukové tkáně.

Tabulka 46 – Vliv podávání gemfibrozilu na parametry lipidového a sacharidového metabolismu.

Parametr	HHTg + VS	HHTg + VS + gemfibrozil	P
epididymal. tuk. tkáň, g/100g	2,17 ± 0,09	1,72 ± 0,08	< 0,01
sérové triglyceridy, mmol/l	2,94 ± 0,26	0,94 ± 0,06	< 0,001
glykémie, mmol/l	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,3	N.S.
OGTT – AUC mmol/2hod	756 ± 66	713 ± 13	N.S.
triglyceridy v játrech μmol/g	22,5 ± 1,8	15,5 ± 1,0	< 0,01
cholesterol v játrech μmol/g	6,84 ± 0,37	5,95 ± 0,42	N.S.

Hodnoty udávají průměr ± SE, počet zvířat ve skupině 7.

Tabulka 47 – Vliv podávání gemfibrozilu na parametry oxidačního stresu v séru / plazmě.

SERUM / PLASMA	HHTg	HHTg + VS	HHTg + VS + gemfibrozil
Tg (mmol/l)	2,21 ± 0,05	2,94 ± 0,26*	0,94 ± 0,06+++
GSH (mmol/l)	1,06 ± 0,07	0,68 ± 0,08*	0,79 ± 0,05
SOD (U/ml)	0,284 ± 0,014	0,187 ± 0,005*	0,297 ± 0,012++
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/ml)	174 ± 18	125 ± 12*	350 ± 31++
GPx (μmol GSH/min/ml)	440 ± 24	245 ± 23*	379 ± 19++
TBARS (nmol/l)	1,24 ± 0,06	1,70 ± 0,07*	1,42 ± 0,08++
CD (nmol/l)	38,94 ± 2,42	55,34 ± 2,29*	33,61 ± 1,42++

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (7 zvířat ve skupině).

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ HHTg + VS vs HHTg (t-test).

+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ HHTg + VS + gemfibrozil vs HHTg + VS (t-test).

HHTg – HHTg potkání standardní dieta

HHTg + VS - HHTg potkání vysokosacharózová dieta

HHTg + VS + gemfibrozil – HHTg potkání po podání gemfibrozilu v dávce 0,1% po dobu 3 týdnů

Dieta – standardní / vysokosacharózová

Stáří zvířat – 12 měsíců

Tabulka 48 – Vliv podávání gemfibrozilu na parametry oxidačního stresu v myokardu.

MYOKARD	HHTg	HHTg + VS	HHTg + VS + gemfibrozil
Tg (μmol/g)	1,18 ± 0,10	1,19 ± 0,09	1,36 ± 0,20
GSH (mmol/mg protein)	1,32 ± 0,05	1,36 ± 0,07	1,26 ± 0,09
αToc (nmol/g)	71,41 ± 5,65	55,50 ± 6,93	49,33 ± 3,37
γToc (nmol/g)	0,976 ± 0,123	0,421 ± 0,083*	0,457 ± 0,041
αToc/Tg (nmol/μmol)	6,227 ± 1,291	5,083 ± 0,626	3,904 ± 0,451
γToc/Tg (nmol/μmol)	0,095 ± 0,020	0,033 ± 0,008*	0,038 ± 0,007
SOD (U/mg protein)	0,530 ± 0,080	0,329 ± 0,053	0,800 ± 0,108++
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	175 ± 9	207 ± 14	252 ± 15++
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	323 ± 15	306 ± 16	335 ± 19
TBARS (nmol/mg protein)	1,57 ± 0,08	2,18 ± 0,15*	1,88 ± 0,16+
CD (nmol/mg protein)	58,92 ± 3,51	77,11 ± 3,28*	64,63 ± 3,65++

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (7 zvířat ve skupině).

Statistická významnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ HHTg + VS vs HHTg (t-test).

+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ HHTg + VS + gemfibrozil vs HHTg + VS (t-test).

HHTg – HHTg potkani standardní dieta

HHTg + VS - HHTg potkani vysokosacharózová dieta

HHTg + VS + gemfibrozil – HHTg potkani po podání gemfibrozilu v dávce 0,1% po dobu 3 týdnů

Dieta – standardní / vysokosacharózová

Stáří zvířat – 12 měsíců

Tabulka 49 – Vliv podávání gemfibrozilu na parametry oxidačního stresu v játrech.

JÁTRA	HHTg + VS	HHTg + VS + gemfibrozil	P
GSH (mmol/mg protein)	1,14 ± 0,07	1,33 ± 0,07	< 0,01
SOD (U/mg protein)	0,352 ± 0,023	0,533 ± 0,013	< 0,01
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	353 ± 13	383 ± 18	< 0,01
GPx (μmol GSH/min/mg protein)	503 ± 11	498 ± 10	NS
TBARS (nmol/mg protein)	2,10 ± 0,12	2,19 ± 0,15	NS
CD (nmol/mg protein)	105,03 ± 5,88	76,40 ± 2,84	< 0,01

Data jsou uváděna jako průměry ± SEM (7 zvířat ve skupině).

HHTg + VS - HHTg potkani vysokosacharózová dieta

HHTg + VS + gemfibrozil – HHTg potkani po podání gemfibrozilu v dávce 0,1% po dobu 3 týdnů

Dieta – vysokosacharózová

Stáří zvířat – 12 měsíců

Závěr : Podávání gemfibrozilu mělo podle očekávání výrazný hypolipidemický účinek, který byl spojen se sníženou lipoperoxidací v plazmě, myokardu i v játrech. Naproti tomu, podávání gemfibrozilu neovlivnilo snížené koncentrace glutationu, α - a γ -tokoferolu v myokardu indukované podáváním diety s vysokým podílem sacharózy. Uvedené výsledky naznačují, že hypolipidemická léčba při závažné hypertriglyceridémii nemusí být dostatečná pro zvýšení všech antioxidačních systémů ve tkáních. Doplnění terapie zvýšeným přívodem antioxidantů by mohlo zvýšit účinnost hypolipidemické terapie z hlediska prevence kardiovaskulárních poruch.

6. DISKUZE

Pokusy uvedené v této disertační práci byly zaměřené na sledování parametrů oxidačního stresu v myokardu, aortě a játrech a jejich možném uplatnění v patogenezi metabolických a kardiovaskulárních poruch provázející metabolický syndrom. Další část práce byla věnována možnostem pozitivního ovlivnění oxidačního stresu nutriční a farmakologickou intervencí.

Negativní důsledky hypertriglyceridemie na oxidační stres ve tkáních

V posledních letech přibývají důkazy o klíčové úloze poruch lipidového metabolismu v patogenezi inzulinové rezistence a jejích komplikacích (Mc Garry 2002). Inzulinová rezistence je asociována nejen s hypertriglyceridemií, ale i se zvýšením sérových koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) a s ektopickým ukládáním triglyceridů (Tg) a jejich meziproduktů (diacylglyceridů, mastných kyselin s dlouhým řetězcem) ve svalové tkáni, játrech a v β -buňkách pankreatu (Lewis a Tracy 2002, Divišová et al 2002).

Studie byly provedeny u kmene potkanů s geneticky fixovanou hypertriglyceridemií. Neobézní kmen HHTg potkanů představuje unikátní model inzulinové rezistence, která není spojena s excesivní akumulací tělesného tuku jako je tomu u obvykle používaných modelů metabolického syndromu - obézních potkanů s genetickou poruchou tvorby leptinu nebo leptinového receptoru. Navíc obezita vždy nemusí provázet metabolický syndrom. Z klinických studií vyplývá, že přibližně 20% pacientů s metabolickým syndromem není obézních.

U HHTg potkanů je hypertriglyceridemie asociována s hyperinzulinemií, rezistencí tkání k účinku inzulinu, zhoršenou glukózovou tolerancí a mírnou hypertenzí (Vrána et al 1990). Zvýšený přísun fruktózy nebo sacharózy vede k výraznému zvýšení triglyceridemie, k akumulaci Tg v játrech a ke zvýšené produkci VLDL z jater (Vrána et al 1993). Tento model je vhodný ke studiu mechanismů podmiňujících rozvoj inzulinové rezistence a jejích komplikací u neobézních jedinců a ke sledování účinků mírné nutričně indukované obezity vyvolané zvýšeným kalorickým příjmem diety s vysokým podílem sacharózy nebo tuků.

V našich studiích byl rozvoj metabolických poruch spojených s inzulinovou rezistencí a metabolickým syndromem potencován podáváním diety s vysokým podílem sacharózy, přičemž ve srovnání s kontrolními potkany, jsou HHTg potkani k tomuto nutričnímu podnětu extrémně citliví. Kmen HHTg potkanů byl vyselektován z potkanů Wistar na základě zvýšených hladin sérových triglyceridů po přívodu vysokosacharóзовé diety (Vrána et al 1990).

Výsledky našich studií provedených u HHTg potkanů ukázaly, že kromě výrazné hypertriglyceridémie vykazovali HHTg potkani zhoršenou glukózovou toleranci během OGTT, hyperinzulinémií, zvýšené koncentrace NEMK a sníženou senzitivitu svalové i tukové tkáně k účinku inzulinu (tabulka 11, obrázky 5 a 6). Tyto metabolické abnormality u potkanů s hereditární hypertriglyceridémií byly spojeny se zvýšenými sérovými hladinami lipoperoxidačních produktů a se sníženou koncentrací glutationu a aktivitou antioxidačních enzymů, katalázy a glutationreduktázy (tabulka 12). Lipoperoxidační produkty, měřené jako TBARS, pozitivně korelovaly s hladinami triglyceridů v séru. Naproti tomu sérové koncentrace glutationu a γ -tokoferolu vykazovaly negativní korelaci s koncentrací triglyceridů v séru. Tyto nálezy naznačují důležitou, zatím neobjasněnou roli glutationu a γ -tokoferolu v patogenezi vaskulárních poruch. Na rozdíl od klinických studií, ve kterých byly u pacientů pozorovány snížené sérové koncentrace α -tokoferolu (Hopps et al. 2010, Roberts and Sindhu 2009), v recentní klinické studii byly u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním nalezeny snížené koncentrace γ -tokoferolu a nikoliv α -tokoferolu. (Kontush et al 1999).

Zvýšené sérové hladiny lipoperoxidačních produktů u HHTg potkanů jsou v souladu s výsledky klinických studií, v nichž byly pozorovány vyšší plasmatické koncentrace lipoperoxidačních produktů při zhoršené glukózové toleranci, u diabetiků 2. typu a recentně i u pacientů s metabolickým syndromem.

V souvislosti s rizikem kardiovaskulárních poruch při metabolickém syndromu jsou závažné naše nálezy výrazně zvýšené akumulace triglyceridů, akcentované lipoperoxidace a nižší koncentrace glutationu, α - a γ -tokoferolu v intimně-medii aort u hypertriglyceridemických potkanů. Na těchto změnách se může podílet několik mechanismů.

Již dříve byla u modelu HHTg potkanů zjištěna zvýšená oxidabilita lipoproteinových částic LDL a VLDL (Kazdová et al 1997). Ke zvýšené lipoperoxidaci při hypertriglyceridémii mohou přispívat vyšší hladiny volných mastných kyselin ale také vyšší podíl malých denzních LDL, ve kterých je nižší koncentrace vitaminu E a které jsou vysoce aterogenní. Lipoperoxidace se odehrává v cévní stěně při průniku lipoproteinů endotelem a v subendoteliálním prostoru. Pokusy na tkáňových kulturách ukázaly, že se na ní mohou podílet buňky endotelu, hladkého svalstva cév, monocyty a makrofágy (O'Brien a Chait 1994). Oxidativní modifikace lipoproteinů nejen může zvyšovat akumulaci lipidů v arteriální stěně, ale v důsledku vzniku toxických lipoperoxidačních produktů může negativně ovlivnit i prokoagulační aktivitu, proliferaci hladkosvalových buněk a tvorbu NO (Roberts and Sindhu

2009). Pro tento předpoklad svědčí nižší koncentrace NO a cGMP v aortách HHTg potkanů (Obrázek 7), které mohou být důsledkem snížené syntézy NO nebo zvýšené oxidativní degradace NO volnými kyslíkovými radikály.

Zvýšená lipoperoxidace v aortách HHTg potkanů může být také důsledkem nižších koncentrací antioxidantů. Koncentrace glutationu byla u HHTg potkanů snížena o 35%. Glutathion je důležitý intracelulární antioxidant, který má podle současných představ důležitou roli nejen při odstraňování produktů lipoperoxidace, ale i v regulaci genové exprese, produkce cytokínů a apoptózy (Wu et al 2004).

Ke zvýšení rizika vaskulárních poruch při metabolickém syndromu mohou přispívat i výrazně snížené koncentrace α - a γ -tokoferolu v intimě-medii aort, které byly sníženy u HHTg potkanů o 70%.

Zatímco je značná pozornost věnována úloze α -tokoferolu v souvislosti s oxidativní modifikací lipoproteinů, méně je známo o možných důsledcích nižších koncentrací γ -tokoferolu. Podle recentních poznatků má γ -tokoferol v porovnání s α -tokoferolem větší antioxidační aktivitu, účinněji vychytává peroxynitrity, ovlivňuje aktivitu SOD, aktivuje cyklooxygenázu, má protizánětlivé a antikoagulační účinky (Traber 2007). Snížené hladiny γ -tokoferolu mohou těmito mechanismy zvyšovat riziko kardiovaskulárního poškození. Naše nálezy ukazují, že sledování plazmatických koncentrací γ -tokoferolu, které dosud není běžné v klinické praxi, by mohlo přispět k lepšímu pochopení působení vitamínu E, přestože jeho koncentrace v séru jsou přibližně 10x krát nižší než α -tokoferolu. Z hlediska prevence kardiovaskulárního poškození jsou důležité funkce obou tokoferolů a rovněž jsou důležité koncentrace v arteriální stěně a myokardu, kde dochází k nežádoucímu poškození lipoproteinů, především LDL. Poškození lipoproteinů v plazmě je málo pravděpodobné vzhledem k silné antioxidační kapacitě plazmy. γ -Tokoferol je lepším ukazatelem tkáňových koncentrací vitamínu E, které jsou místem jeho skutečného působení. Jak vyplývá z našich studií sérové koncentrace nemusí vždy odpovídat tkáňovým koncentracím.

Tyto nálezy podporují hypotézu, že v patogenezi vaskulárních komplikací doprovázejících metabolický syndrom může mít důležitou úlohu oxidační stres, ke kterému může přispívat jak zvýšené množství lipidů, jako substrátu pro oxidaci, tak i nižší aktivita antioxidačních systémů.

Po řadu let byla pozornost v oblasti oxidačního stresu zaměřena na negativní účinky hyperglykémie (Evans et al 2003). Vzhledem k tomu, že inzulinová rezistence předchází vzniku hyperglykémie, je nepravděpodobné, že v prediabetickém stavu, kterým je

metabolický syndrom, je oxidační stres vyvolán samotnou hyperglykémií. Podávání vysokosacharóзовé diety u HHTg potkanů jen mírně ovlivňuje glukózovou toleranci, ale výrazně zvyšuje sérové koncentrace triglyceridů a NEMK, které mohou indukovat oxidační stres. Tyto skutečnosti podporují hypotézu o uplatnění lipotoxicity v oxidačním stresu spojeném s inzulínovou rezistencí a metabolickým syndromem.

Vliv věku, obezity a hypertenze na oxidační stres

Přibývajícím věku patří mezi další faktory, které zvyšují prevalenci metabolického syndromu, diabetu 2. typu i kardiovaskulárních onemocnění ([Yki-Järvinen 1995](#)). I když zvýšení sérových koncentrací indikátorů oxidačního stresu bylo pozorováno v experimentálních i klinických studiích, zůstává neobjasněno do jaké míry se v těchto poruchách uplatňuje oxidační stres ve tkáních. V naší studii jsme zjistili, že v průběhu stárnutí u kontrolních i HHTg potkanů nedošlo ke změnám v triglyceridemii, ani v sérových a tkáňových koncentracích α - a γ -tokoferolu v porovnání se zvířaty ve věku 3 měsíců. Naproti tomu u kontrolních zvířat došlo k mírnému a u HHTg potkanů k výraznému snížení aktivity antioxidantních enzymů – SOD, katalázy, GPx. Přibývajícím věku zvyšoval oxidační stres v myokardu, kde podobně jako v séru, u kontrolních zvířat byly mírně a u HHTg potkanů výrazně sníženy hladiny glutathionu, α - a γ -tokoferolu, katalázy GPx a GR. Kataláza, která se podílí na detoxifikaci H_2O_2 , může také významně ovlivnit věkem indukované změny kardiovaskulárního systému, zejména oxidační poškození proteinů, které má souvislost se zhoršenou funkcí myokardu v procesu stárnutí. Tato hypotéza byla potvrzena i v další experimentální studii, kde zvýšená exprese katalázy v myokardu bránila nežádoucí oxidaci proteinů a chránila myocyty před věkem indukovanými poruchami kontraktility ([Qin et al 2009](#)). Zvýšená exprese katalázy v mitochondriích u transgenních myší byla spojena s 20% prodloužením života tohoto experimentálního modelu ([Schriner et al 2005](#)). Závažným nálezem z hlediska oxidačního stresu je i pokles aktivity SOD. Ta má významnou roli v ochraně mitochondrií před působením volných radikálů, které mohou přispívat k rozvoji mitochondriálních dysfunkcí. První z molekul, která může být poškozena superoxidovým radikálem, je mitochondriální DNA, neboť není tak chráněná jako jaderná DNA. Zvýšená exprese mitochondriální SOD u myší prodlužovala délku života a snižovala neurotoxicitu ([Hu et al 2006](#)).

Naše výsledky ukazují, že nižší aktivita antioxidantního systému může být pravděpodobně příčinou zvýšené tvorby lipoperoxidačních produktů, které byly u zvířat starých 16 měsíců v porovnání se zvířaty ve věku 4 měsíců zvýšeny v séru i v myokardu na dvojnásobné

hodnoty jak u kontrolních tak u HHTg potkanů, zatímco triglyceridemie ani množství tělesného tuku nebyly s přibývajícím věkem ovlivněny.

K dalším faktorům, které jsou součástí poruch asociovaných s metabolickým syndromem je obezita, která výrazně prohlubuje poruchy inzulinové rezistence a zvyšuje riziko rozvoje předčasné aterosklerózy.

Cílem dalších pokusů bylo zjistit do jaké míry kombinace mírné obezity navozené dlouhodobým podáváním diety s vysokým podílem sacharózy v kombinaci s hypertriglyceridemií ovlivní parametry oxidačního stresu. Zjistili jsme, že podávání vysokosacharóзовé diety po dobu 4 měsíců v porovnání s podáváním této diety po dobu dvou týdnů zvýšilo tělesnou hmotnost, hmotnost viscerální tukové tkáně a triglyceridémii. Tento model nutričně indukované obezity lépe odpovídá situaci u člověka, vzhledem k tomu, že zvýšený příjem sacharózy v posledních letech v souvislosti s používáním fruktóзовého sirupu v potravinářském průmyslu je považován za jednu z příčin nárůstu obezity a kardiovaskulárních poruch. Nejvýraznější změnou, ke které došlo u nutričně indukované obezity byly výrazně snížené koncentrace α - a γ -tokoferolu v intimě-medii aort a v myokardu a to jak v absolutním množství tak i při přepočtu na obsah triglyceridů. V důsledku nižší antioxidační aktivity vedla nutričně indukovaná obezita ke zvýšení tvorby lipoperoxidačních produktů. Získané výsledky podporují hypotézu o negativním účinku dlouhodobého příjmu diety s vysokým podílem sacharózy a synergického vlivu hypertriglyceridémie a obezity na rozvoj rizika kardiovaskulárních poruch.

Je zajímavé, že geneticky indukovaná obezita na rozdíl od nutričně indukované obezity neovlivnila sérové hladiny α - a γ -tokoferolu, zatímco koncentrace α - a γ -tokoferolu v intimě-medii aort byly obdobně sníženy u obou kmenů. Tyto výsledky ukazují, že sérové koncentrace nemusí vždy odrážet koncentrace antioxidantů ve tkáních.

Snížená aktivita katalázy a GPx u obézních HHTg potkanů v našich pokusech je v souladu s dalšími experimentálními studiemi. U obézních potkanů Fischer byla pozorována snížená exprese antioxidačních enzymů SOD a glutathionperoxidázy v aortě (Roberts et al 2006). U dalších experimentálních modelů nutričně vyvolaná obezita byla spojena s poškozením vazodilatace způsobenou sníženou dostupností NO (Galili et al 2007). Rovněž v našich dřívějších studiích byly u HHTg potkanů sníženy koncentrace NO jak v séru tak i v aortě (Kazdová et al 1997). Nezastupitelnou úlohou NO je udržování vazodilatace v cévách stimulací tvorby cGMP v hladkých svalech cév. Nižší koncentrace NO, která může být

důsledkem snížené syntézy nebo zvýšené inaktivace NO volnými kyslíkovými radikály, může souviset s dříve zjištěnými poruchami vazodilatace u HHTg potkanů (Edelsteinová et al 1993).

V našich pokusech byla hypertriglyceridémie spojena se sníženou koncentrací NO a rovněž se sníženými koncentracemi cGMP, který je po stimulaci adenylátcyklázy oxidem dusnatým skutečným vasorelaxačním agens. Nižší biologická dostupnost NO byla prokázána také v aortách SHR potkanů (Cosentino et al 1998). NO může mít v závislosti na lokálním množství ROS, zejména superoxidu O_2^- dvojitý účinek. Při relativně vyšší produkci volných radikálů vznikají reakcí NO se superoxidovým radikálem vysoce toxické peroxynitrity NOO-. Naopak při vyšší produkci NO reaguje NO s alkoxylovými radikály a ukončuje tak řetězovou reakci, takže působí v této situaci jako antioxidant (Beckman et al 1990). Z posledních nálezů vyplývá, že NO potlačuje aktivitu NADPH oxidázy (Dusting et al 2005) a tím může blokovat zdroje oxidačního stresu v arteriální stěně.

Účinek NO tak závisí na lokálních poměrech v arteriální stěně – na dostupnosti substrátu pro syntézu NO, na aktivitě NO syntézy, na lipoperoxidačních procesech a na množství vznikajících radikálů. Nebezpečné peroxynitrity jsou účinněji vychytávány γ -tokoferolem, proto výrazně snížené hladiny γ -tokoferolu v aortách HHTg potkanů mohou přispívat ke zvýšení oxidačního stresu v arteriální stěně a poruchám vazodilatace.

Tyto nálezy ukazují, že lokální vaskulární oxidační stres může být důležitou determinantou endoteliální dysfunkce spojenou s včasným stádiem obezity nebo věkem indukovaných poruch.

Dalším faktorem, který může hrát roli v indukci oxidačního stresu a endoteliální dysfunkci je hypertenze. Otázky vlivu oxidačního stresu na sérové hladiny NO jsme analyzovali u skupiny juvenilních hypertoniků s cílem zjistit do jaké míry jsou v iniciačních fázích hypertenze zapojeny změny antioxidační aktivity a lipoperoxidace. Výsledky naší studie ukázaly, že u juvenilních hypertoniků byla mírně zvýšená triglyceridémie spojena s významně nižšími sérovými hladinami kyseliny askorbové a α -tokoferolu. Naproti tomu u juvenilních hypertoniků nebyly v porovnání s normotenzními kontrolami hladiny lipoperoxidačních produktů ani NO ovlivněny.

Závažným důsledkem zvýšeného oxidačního stresu v cévní stěně může být dysfunkce endotelu v důsledku snížené dostupnosti oxidu dusnatého působením volných radikálů.

Oxidační stres při hyperglykémii

Vliv hyperglykémie na oxidační stres je po řadu let předmětem intenzivního studia zejména v souvislosti s patogenezí mikrovaskulárních komplikací diabetu. Příčinou zvýšené tvorby ROS a jejich sníženého odstraňování při diabetu může být řada metabolických a humorálních odchylek, především hyperglykémie nebo hyperlipidémie, které jsou pro diabetes typické a které mohou být přítomny ještě v období před manifestací diabetu. Chronická hyperglykémie může indukovat oxidační stres řadou mechanismů jako je tvorba konečných produktů pokročilé glykace (AGE), jejich autooxidace a interakce s buněčnými receptory, aktivace rozličných izoform proteinkinázy C, indukce polyolových sloučenin a zvýšená aktivita metabolické dráhy hexosaminů (Grattagliano et al 2008). Proteiny se stávají předmětem glykace, což například v případě SOD a dalších enzymů může narušit antioxidační mechanismy. S tímto předpokladem jsou v souladu naše nálezy výrazně snížené aktivity SOD, katalázy a GPx v séru a v myokardu u potkanů se streptozotocinovým diabetem. Snížená aktivita glutation-dependentních enzymů byla pravděpodobně důsledkem nižšího obsahu glutationu v séru a v myokardu diabetických potkanů. Zajímavé nálezy jsme získali při vyšetření vlivu diabetu na koncentrace α - a γ -tokoferolu. U diabetických potkanů sérové koncentrace α - a γ -tokoferolu byly výrazně sníženy, nižší byly i koncentrace α -tokoferolu v myokardu. Překvapivým nálezem byly o 50% zvýšené koncentrace α -tokoferolu a mírně zvýšené koncentrace γ -tokoferolu v aortách diabetických potkanů. Navzdory zvýšené koncentraci α - a γ -tokoferolu byla v aortách a v myokardu diabetických potkanů výrazně zvýšena tvorba lipoperoxidačních produktů. Je zajímavé, že asociace zvýšených koncentrací α -tokoferolu se zvýšenou tvorbou produktů lipoperoxidace byla pozorována v myokardu u diabetických potkanů (Jain a Levine 1995). Vysvětlením pro tyto nálezy je pravděpodobně zvýšená akumulace lipidů při současném nedostatku koantioxidantů, které převádějí tokoferolový radikál z lipofilního do hydrofilního prostředí. Podle jedné z teorií mohou zvýšené koncentrace α -tokoferolu ve tkáních mít i negativní prooxidační účinky (Kontush et al 1996). Podobně překvapivé výsledky v myokardech diabetických potkanů byly pozorovány také u SOD (Shirpoor et al 2009) a katalázy (Stefek et al 2000). Zvýšené aktivity těchto antioxidačních enzymů v myokardu byly spojeny se zvýšenou lipoperoxidací a oxidací proteinů. Z těchto nálezů vyplývá, že otázky týkající se suplementace diabetiků vitaminem E nejsou objasněny. Pravděpodobně důležitější úlohu v antioxidačním systému u diabetiků mohou mít poruchy syntézy glutationu a utilizace kyseliny askorbové ve tkáních, kdy jsou využívány pro intracelulární transport podobné mechanismy jako pro transport glukózy.

Snížené koncentrace kyseliny askorbové, α -tokoferolu a glutationu a nižší aktivita SOD byly zjištěny v plazmě diabetiků a diabetických potkanů (Yoshida K 1995).

Naše výsledky podporují hypotézu, že na zvýšeném oxidačním stresu při hyperglykémii se významnou měrou podílí snížená koncentrace glutationu a snížená aktivita antioxidačních enzymů. Těmito mechanismy chronická hyperglykémie může zhoršit funkci endotelu a indukovat rozvoj makro- a mikrovaskulárních komplikací (Haidara et al 2006, Evans et al 2003).

Oxidační stres a jaterní steatóza

Nealkoholická jaterní steatóza postihuje 20-30% jedinců v rozvinutých zemích. Často je spojena s obezitou a inzulinovou rezistencí a je běžná u pacientů s metabolickým syndromem (Clark, 2006; Rector et al 2008). V současné době je považována za novou ale velmi významnou komponentu metabolického syndromu. Pro NAFLD je typické široké spektrum poškození jater, od prosté steatózy, která může přejít v nealkoholickou steatohepatitidu (NASH), a dále fibrozu a cirhozu (Schreuder et al 2008). Patofyziologické mechanismy NAFLD nebyly dosud zcela objasněny a málo se ví o faktorech, které jsou odpovědné za změnu prosté hepatické steatózy ve steatohepatitidu a proč se to stane jen u některých jedinců. Podle tzv. „two-hit“ hypotézy, představuje jaterní steatóza jen stav, který nezpůsobuje vážné poškození jater, ale jen predisponuje steatózní játra k různým dalším škodlivým vlivům, jako jsou oxidační stres nebo prozánětlivé cytokiny (Day a James 1998). Na druhé straně, rozsah steatózy dobře koreluje s progresí ve steatohepatitidu u lidí (Wanless a Lentz 1990) a několik studií, publikovaných v poslední době, také naznačilo, že hromadění tuku v játrech a zvláště spektrum mastných kyselin v jaterních lipidech by mohlo být v kauzálním vztahu k vývinu NASH (Gentile a Pagliassotti 2008).

U našeho modelu jaterní steatózy a metabolického syndromu transgenních SREBP-1a potkanů vedla zvýšená exprese genů regulujících syntézu lipidů (Scd1 a Fas) k výrazné akumulaci triglyceridů (+249%) a cholesterolu (+65%) v játrech. Takto vyvolaná jaterní steatóza byla spojena se zvýšenou lipoperoxidací a se sníženou kapacitou antioxidačního systému v důsledku deficience α - i γ -tokoferolu v séru a snížené syntézy glutationu a nižší aktivity antioxidačních enzymů v játrech. V této souvislosti je zajímavé, že nízké hladiny α -tokoferolu byly pozorovány i u pacientů se steatohepatitidou (Bahcecioglu et al 2005). Analýza profilu mastných kyselin v membránových fosfolipidech ukázala, že jaterní steatóza byla spojena se zvýšeným podílem saturovaných mastných kyselin a s výraznou deplecí

mastných kyselin řady n-3 ([Malínská et al 2009](#)). Tyto změny mohou negativně ovlivnit permeabilitu membrán, predispozici k zánětu a rezistenci tkání k účinku inzulinu ([Calder et al 2007](#), [Griffin et al 2006](#)). Snížená aktivita antioxidačních enzymů spolu s deplecí redukované formy glutationu a deficitem vitamínu E v séru, mohou přispívat k prohloubení oxidačního stresu. Glutathion je důležitý intracelulární antioxidant, který je v játrech syntetizován. Snížená antioxidační kapacita může být jednou z příčin poklesu polynenasycených mastných kyselin, které jsou velmi citlivé k lipoperoxidaci. Důležitou ochrannou roli pro nenasycené mastné kyseliny a membránové fosfolipidy má zejména vitamin E. Změny ve složení mastných kyselin mohou ovlivnit lipidový metabolismus a spolu se zvýšeným oxidačním stresem mohou potencovat zánět a přechod prosté steatózy k steatohepatitidě. Pro tento předpoklad svědčí recentní histologicky prokázané zánětlivé infiltráty v játrech u 16 měsíců starých SHR potkanů se zvýšenou expresí SREBP-1a ([Obrázek 17](#), [Pravenec – osobní sdělení](#)).

Naše výsledky ukazují, že nadměrná akumulace lipidů v játrech indukovaná genetickou predispozicí ke zvýšené syntéze lipidů v játrech zvyšovala oxidační stres, který časem překoná kapacitu antioxidačních systémů v játrech a spolu s indukcí zánětlivé reakce může přispívat ke vzniku NASH.

Akcentová syntéza lipidů u transgenních SREBP-1a potkanů zvyšovala nejen jaterní steatózu, ale vedla i ke zvýšené akumulaci lipidů ve svalové tkáni a v aortě. Negativním důsledkem ektopického ukládání lipidů byla snížená senzitivita svalové tkáně k účinku inzulinu ([Obrázek 16](#)), která přispívá k rozvoji inzulinové rezistence. Akumulace triglyceridů v aortě, která byla u transgenních zvířat zvýšena na dvojnásobek, přispívá k rozvoji předčasné aterosklerózy. Podle jedné z teorií mohou být lipidy ukládány i v epikardiální oblasti myokardu, a mohou vést ke snížení energetického metabolismu myokardu ([Perseghin et al 2007](#)). Perseghin prokázal, že osoby se zvýšeným množstvím jaterních lipidů vykazovaly také zvýšení epikardiálních lipidů. Výsledky u našeho modelu podporují hypotézu, která zdůrazňuje důležitost NAFLD jako nezávislého faktoru kardiovaskulárního poškození ([Targher 2007](#)).

Možnosti nutriční a farmakologické intervence

Metabolické účinky CLA

CLA patří mezi polynenasycené mastné kyseliny řady n-6, která je obsažena v masu a mléce přežvýkavců. V některých studiích byly prokázány její antiadipogenní, antiaterogenní a protizánětlivé účinky ([Moloney et al 2007](#)), které vedly k doporučení CLA jako potravinového doplňku pro snížení tělesné hmotnosti. Výsledky klinických studií jsou však značně rozporuplné a nekonzistentní. Mechanizmy jejího působení ani účinky u metabolického syndromu nejsou objasněny.

V naší studii jsme zjistili, že CLA u experimentálního modelu metabolického syndromu snížila tělesnou hmotnost i množství viscerální tukové tkáně, zlepšila parametry lipidového i sacharidového metabolismu a stimulovala sekreci adiponektinu. V tukové tkáni podávání CLA zlepšilo senzitivitu k účinku inzulinu a zvýšilo lipolýzu mastných kyselin, která nebyla spojena s nežádoucím ektopickým ukládáním triglyceridů. Podávání CLA bylo rovněž spojeno se zlepšením oxidačního stresu v játrech. Výsledky podporují hypotézu o příznivých účincích CLA při metabolickém syndromu.

Někteří autoři ([Andreoli 2009](#)) publikovali, že CLA jako polynenasycená mastná kyselina zvyšuje hladiny glutathionu tím, že indukuje enzymy zahrnuté do jeho biosyntézy. Schopnost CLA chránit před nežádoucí lipoperoxidací je pravděpodobně založena na jiném mechanismu. Může se uplatňovat přímé antioxidační působení, ale někteří autoři to popírají. CLA může rovněž zlepšovat stabilitu membránových lipidů a tím chránit membrány před lipoperoxidací. V naší studii mělo podávání CLA příznivý vliv na hladiny glutathionu a aktivitu glutathion-dependentních enzymů v játrech. Naproti tomu příznivý účinek CLA na hladiny lipidů a celkovou tělesnou kompozici nebyl spojen se zlepšením oxidačního stresu v myokardu. CLA prostřednictvím zlepšení homeostázy glutathionu může přispívat k ochraně před rozvojem NAFLD. Příznivé účinky CLA v prevenci a rozvoji NAFLD byly pozorovány i u obézních potkanů kmene Zucker *fa/fa* ([Nagao et al 2005](#)). Rovněž u potkanů s deficitem vitamínu E CLA snižovala lipoperoxidaci a zlepšovala antioxidační stav v játrech ([Kim et al 2005](#)). Ve studii, která srovnávala účinky CLA a dalších PUFA n-3 i n-6, jen CLA výrazně zvyšovala syntézu glutathionu bez zvýšení lipoperoxidace ([Arab et al 2006](#)). Svým příznivým účinkem na syntézu glutathionu se může CLA podílet na modulaci redox stavu buňky. Mezi prioritní nálezy při podávání CLA patří především snížená akumulace lipidů v játrech, kosterních svalech, myokardu a v intimě-medii aort a zlepšení senzitivity tukové tkáně k účinku inzulinu. Tyto otázky nebyly sledovány v žádné studii. Někteří autoři upozorňují na

rozdílné účinky obou hlavních izomérů CLA, které jsou v dietních suplementacích zastoupeny ve stejném poměru, zatímco v dietních zdrojích je preferován izomer t9-c11 (Riserus et al 2004). Některé negativní účinky CLA jsou připisovány právě izoméru c10-t12, který je jen minoritně zastoupen v dietních zdrojích.

V mechanismu působení CLA hraje pravděpodobně důležitou roli její pozitivní vliv na tukovou tkáň, který má pak následně příznivé účinky na ostatní tkáně. Tento fakt je v souladu s tím, že CLA zvyšovala hladiny adiponektinu, který má inzulin senzitivizující účinky.

Účinky vitamínu E

Podávání α -tokoferolu HHTg potkanům zvyšovalo koncentrace tohoto antioxidantu v arteriální stěně i myokardu, výrazně snížilo parametry lipoperoxidace v séru i v myokardu a zvýšilo hladinu glutationu v séru. Aktivita antioxidantních enzymů nebyly podáváním vitamínu E ovlivněny.

Velké intervenční studie s podáváním vitamínu E zatím nepřinesly pozitivní výsledky. Zatímco observační klinické a experimentální studie většinou potvrdily pozitivní účinek vitamínu E na kardiovaskulární riziko. Recentní studie naznačily, že suplementace vitamínem E, která představuje pouze formu α -tokoferolu, může mít negativní vliv na biodostupnost ostatních tokoferolů (Wolf 2006). Suplementace α -tokoferolu může vést ke snížení cirkulujících hladin γ -tokoferolu v důsledku vyšší afinity α -tokoferolu k jaternímu proteinu TTP (tocopherol transfer protein), který přenáší tokoferol do lipoproteinových částic VLDL a přednostně vestavuje α -tokoferol do těchto lipoproteinů (Traber 2007). Přestože v experimentálních studiích s radioaktivně značenými látkami bylo pozorováno snížení hladin γ -tokoferolu po podání vysokých dávek α -tokoferolu (Traber 2007), v našich studiích jsme tento negativní jev nepozorovali. Je pravděpodobné, že při současném dostatečném dietním příjmu γ -tokoferolu, se nemusí projevit jeho snížení po podání α -tokoferolu.

Metabolické účinky glutationu

Snížené plazmatické hladiny glutationu byly pozorovány v klinických studiích u pacientů s diabetem, po mozkové příhodě, při kardiovaskulárním onemocnění (Haaften et al 2003) a také u skupiny vegetariánů (Nagyová a Ginter 1995). Rovněž naše studie u experimentálních modelů prokázaly výrazné snížení sérových i tkáňových koncentrací glutationu při hypertriglyceridemii, diabetu, nutričně indukované obezitě nebo v průběhu stárnutí. Glutathion kromě toho, že je kofaktorem antioxidačních enzymů má i řadu dalších funkcí – přímo vychytává radikály $\cdot\text{OH}$, účastní se přenosu aminokyselin přes buněčnou membránu a redukuje přímo nebo nepřímo tokoferolový radikál. Podávání glutathionu v klinických studiích k léčení komplikací diabetu nebo následků deficitu proteinů v potravě je komplikováno jeho krátkým poločasem a nedostatečným průnikem do intracelulárního prostoru. U pacientů s DMT2 infuze glutathionu zvyšovala inzulinovou senzitivitu (De Mattia et al 1998). Výhodnější je proto podávání metyl- nebo etylesterů glutathionu, které snadněji přecházejí přes buněčnou membránu do intracelulárního prostoru, kde jsou hydrolyzovány na GSH. V našich pokusech intraperitoneální aplikace glutathionu etyl esterů (GEE) dvakrát denně po dobu čtyř dnů zvýšilo hladiny glutathionu v séru i v myokardu, příznivě ovlivnilo další složky antioxidačního systému a snížilo lipoperoxidaci. Většina intracelulárního glutathionu 85-90% se nachází v cytosolu, zbytek pak v mitochondriích, jádře i peroxisomech. Poměr oxidované a redukované formy glutathionu GSH/GSSG je důležitým ukazatelem redox stavu buňky a porušení tohoto poměru může aktivovat některé signální dráhy včetně aktivace NFkB, c-Jun N-terminální kinázy, MAPK. Zvýšená aktivace těchto signálních drah pak vede ke zvýšené buněčné proliferaci a apoptóze a mohou se tak uplatňovat ve zhoršení inzulinové rezistence a kardiovaskulárním poškozením (Wu et al 2004).

Deplece glutathionu vyvolaná podáním inhibitoru glutathionsyntázy nejen zvyšovala oxidační stres, ale také významně zhoršovala glukózovou toleranci a senzitivitu tukové tkáně k účinku inzulinu u HHTg potkanů. Tyto výsledky podporují hypotézu, podle které oxidační stres může potencovat metabolické změny spojené s inzulinovou rezistencí a metabolickým syndromem. Snížení antioxidační ochrany v důsledku deplece glutathionu, může také přispívat ke zvýšení lipoperoxidace pozorované po podání BSO, přestože má tato látka hypolipidemický účinek. Deplece glutathionu v myokardu vedla ke snížení aktivity GPx a zvýšení aktivity GR, které pravděpodobně působí jako kompenzační mechanismy ve snaze udržet hladinu redukovaného glutathionu. Oba glutathion-dependentní enzymy GPx i GR udržují rovnováhu mezi redukovanou a oxidovanou formou glutathionu.

Podle recentních poznatků glutation spolu se zvýšeným oxidačním stresem jsou zapojeny do regulace apoptózy buněk (Franco et al 2007).

Hyperglykémie vede při diabetu k depleci NADPH (jako důsledek polyolové cesty) (Lee a Chung 1999), který je hlavním kofaktorem glutationreduktázy pro regeneraci redukované formy glutationu. Glutation má podle současných představ důležitou roli nejen při odstraňování produktů lipoperoxidace, ale i v syntéze prostaglandinů, regulaci genové exprese, produkce cytokinů a apoptózy (Wu et al 2004).

Metabolické účinky kyseliny lipoové

Kyselina lipoová působí jako multifunkční antioxidant, který zlepšuje inzulínovou senzitivitu u diabetických pacientů. Rovněž působí jako potenciální terapeutická látka pro chronická onemocnění spojená s oxidačním stresem. Příznivý účinek LA může souviset s její schopností udržet redox potenciál buňky a dále se předpokládá její stimulační účinek na translokaci glukózových transportérů GLUT4. Při diabetu není narušen transport LA do buňky jako je například u vitamínu C. Mezi další faktory pozitivního účinku LA patří také její schopnost snížit aktivitu transkripčního faktoru NFκB (Hofmann et al 1998). Zvýšení aktivity NFκB vede k aktivaci celé řady dalších látek, které se ve svém konečném důsledku mohou podílet na vzniku a rozvoji DMT2, inzulínové rezistenci a poškození β-buněk pankreatu.

Na rozdíl od glutationu, kde jako antioxidant funguje pouze jeho redukováná forma, obě formy kyseliny lipoové mohou fungovat jako antioxidanty, i když její redukováná forma je silnějším antioxidantem. Další fakt, který přispívá k jedinečnosti tohoto antioxidantu jsou jeho hydrofilní i hydrofobní vlastnosti. LA má tak amfifilní charakter na rozdíl od vitamínu C, který je hydrofilní a vitamin E hydrofobní. Může tak působit v cytozolu i membránách, v séru i lipoproteinech (Singh a Jialal 2008). Důležitou součástí antioxidačních účinků LA jsou její regenerační schopnosti jiných antioxidantů, vitamínu C, glutationu i koenzymu Q a nepřímo vitamínu E (Packer et al 1995). DHLA je účinnější v regeneraci askorbylového radikálu než glutation. (Suh et al 2004) V naší studii jsme nenalezly zvýšení koncentrací vitamínu E v séru ani v tkáních po podání kyseliny lipoové. Tyto výsledky jsou v souladu s jinými studiemi, které rovněž nepotvrdily zvýšení hladin vitamínu E po podání LA (Biewenga et al 1997). Nicméně tyto studie potvrdily příznivý účinek na syntézu glutationu zvýšením exprese enzymů, které se podílí na jeho syntéze (Biewenga et al 1997). Tyto závěry jsou v souladu i s naší studií, kde podávání LA ovlivnilo především hladiny glutationu a aktivity glutation-dependentních enzymů v myokardu i játrech.

Řada klinických studií přinesla důkazy o příznivém vlivu podávání LA na inzulinovou senzitivitu u diabetických pacientů (Hofmann et al 1998). Jen několik málo studií sledovalo vliv podávání LA na kardiovaskulární komplikace spojené s diabetem a metabolickým syndromem. Zlepšení oxidačního stresu v myokardu po podání LA v naší studii nebylo spojeno se zvýšením všech měřených antioxidantů, nebyly ovlivněny hladiny vitamínu E. Yi a spol (Yi a Maeda 2006) v experimentální studii na diabetických apoE^{-/-} myších zjistili, že podávání LA vedlo ke snížení oxidačního stresu v séru a snížilo rozsah aterosklerotických lézí. Studie však nesledovala parametry oxidačního stresu v myokardu či jiných tkání. V některých studiích podávání LA chránilo před rozvojem obezity (Kim et al 2004), tento účinek jsme v našich pokusech nepozorovali.

Možnosti ovlivnění oxidačního stresu hypolipidemickou terapií

Fibráty, ke kterým patří gemfibrozil se používají k léčbě dyslipidemií. Výsledky klinických studií, ve kterých gemfibrozil snižoval kardiovaskulární morbiditu a mortalitu u pacientů v diabetické i nediabetické populaci (Calkin et al 2006) naznačují, že vedle výrazného hypolipidemického účinku mohou mít i antiaterogenní efekt nezávislý na jejich vlivu na lipidový metabolismus. Mechanismus tohoto účinku není objasněn, ale jedním z možných vlivů by mohl být příznivý účinek na oxidační stres. V současné době chybí poznatky o účinku fibrátů na oxidační stres spojený s metabolickým syndromem a inzulinovou rezistencí. Podávání gemfibrozilu u HHTg potkanů mělo nejen výrazný hypotriglyceridemický účinek, ale zvyšovalo i aktivitu antioxidantních enzymů v myokardu i játrech, zatímco hladiny neenzymatických antioxidantů glutationu ani α - a γ -tokoferolu v myokardu nebyly ovlivněny. V mechanismu zvýšení aktivity antioxidantních enzymů se může uplatnit zvýšená exprese pro tyto enzymy po podání gemfibrozilu, jak naznačil Inoue (Inoue et al 1998).

Aktivace PPAR α receptorů fibráty vede ke zvýšenému transportu mastných kyselin do jater a stimuluje jejich oxidaci. Tato mobilizace mastných kyselin jednak snižuje hladiny lipidů a potom také vede ke snížení lipoperoxidace, jak jsme pozorovali u HHTg potkanů po podání gemfibrozilu. Podobný antioxidantní účinek byl zaznamenán také po podání agonistů PPAR γ -rosiglitazonu (Šeda et al 2008) u tohoto experimentálního modelu. Příznivé účinky fenofibrátu na oxidační stres byly pozorovány v menší klinické studii u pacientů s kombinovanými dyslipidemiemi, kde tento fibrát snižoval lipoperoxidaci a zvyšoval aktivitu GPx v séru (Tkáč et al 2006).

V naší studii jsme nepozorovali příznivý účinek gemfibrozilu na inzulinovou senzitivitu, který byl nalezen v některých klinických i experimentálních studiích (Koh et al 2008). Na základě

dosavadních studií nelze posoudit do jaké míry antioxidační účinky jsou důsledkem hypolipidemického efektu nebo zda jsou na něm nezávislé.

Závěrem lze uvést, že ochrana buněk proti působení volných radikálů je komplexní proces, zajišťovaný antioxidačními enzymy i nízkomolekulárními antioxidanty a jejich vzájemnou spoluprací. Nelze proto očekávat, že terapie jedním antioxidantem ovlivní celý komplexní antioxidační systém a projeví se pozitivním účinkem na rozvoj metabolických a kardiovaskulárních poruch. Na druhou stranu nedostatek jednoho z antioxidantů a tím porušení celé rovnováhy systému může vést k závažným důsledkům nebo až k rozvoji metabolických poruch. Pro účelné pozitivní ovlivnění poruch vyvolaných oxidačním stresem je nezbytné objasnění jak příčin oxidačního stresu tak vzájemných souvislostí ve funkci antioxidačního ochranného systému. K racionálnímu využití antioxidantů dosud chybí řada poznatků o mechanismu jejich působení.

7. ZÁVĚR

Cílem provedených studií bylo získání nových poznatků o uplatnění oxidačního stresu v rozvoji metabolických poruch asociovaných s metabolickým syndromem a možnostech jeho ovlivnění látkami s antioxidačními a hypolipidemickými účinky. Hlavní poznatky lze shrnout do těchto závěrů:

ÚLOHA OXIDAČNÍHO STRESU V ROZVOJI METABOLICKÝCH PORUCH SPOJENÝCH S METABOLICKÝM SYNDROMEM

- U HHTg potkanů byla zvýšená akumulace triglyceridů v aortě spojena se zvýšením oxidačního stresu v důsledku poklesu glutationu, α - i γ -tokoferolu a zvýšené tvorby lipoperoxidačních produktů. Negativním důsledkem těchto změn byla snížená biologická dostupnost NO.
- Oxidační stres byl výrazně potencován přibývajícím věkem u HHTg potkanů a v menší míře i u normotriglyceridemických kontrol. Kromě výše uvedených změn byla u zvířat ve stáří 16 měsíců snížena i aktivita antioxidačních enzymů (SOD, katalázy, GPx). U těchto zvířat jsme prokázali zvýšený oxidační stres v důsledku snížených koncentrací glutationu, α - i γ -tokoferolu a nižší aktivity antioxidačních enzymů spojených se zvýšenou lipoperoxidací v myokardu HHTg potkanů.
- Dalším faktorem, který přispíval k oxidačnímu stresu v aortách a v myokardu byla přítomnost geneticky fixované obezity nebo obezity vyvolané dlouhodobým příjmem diety s vysokým podílem sacharózy.
- Negativní vliv hypertenze na antioxidační systém jsme zjistili již u juvenilních hypertoniků, u kterých zvýšená triglyceridémie byla spojena s nižšími sérovými hladinami kyseliny askorbové a α -tokoferolu, zatímco v této věkové etáži nebyly ještě ovlivněny koncentrace NO.

- U experimentálního modelu nedostatečně kompenzovaného diabetu, který je provázen hyperglykemií, byly v aortách výrazně sniženy koncentrace glutationu, antioxidačních enzymů a zvýšená lipoperoxidace spojeny se zvýšenou koncentrací α - i γ -tokoferolu. Tento nález považujeme za závažný, vzhledem k tomu, že při nedostatku regenerujících látek pro α -tokoferol, pro což svědčí snižené hladiny GSH a vitamínu C v cytozolu buněk myokardu, se mohou objevit jeho prooxidační účinky.
- U experimentálního modelu nealkoholické jaterní steatózy, u potkanů s expresí SREBP-1a zvýšený oxidační stres v játrech, pro který svědčily snižené koncentrace GSH, α - tokoferolu a nižší aktivita antioxidačních enzymů, vedl v pozdějším věku zvířat k rozvoji steatohepatitidy. Jaterní steatóza byla spojena s negativními důsledky v aortě, kde zvyšovala akumulaci triglyceridů a snižovala α - a γ -tokoferol.

OVLIVNĚNÍ OXIDAČNÍHO STRESU NUTRIČNÍ A FARMAKOLOGICKOU INTERVENCÍ

- Podávání CLA u experimentálního modelu metabolického syndromu snížilo hmotnost viscerální tukové tkáně, snížilo sérové hladiny triglyceridů, glukózy, inzulínu, FFA a tkáňové koncentrace triglyceridů ve svalech, aortě, myokardu a v játrech. V tukové tkáni podávání CLA zlepšilo senzitivitu k účinku inzulínu. V játrech CLA snížila koncentrace oxidovaného GSSH a lipoperoxidací a zvýšila aktivitu antioxidačních enzymů.. Výsledky podporují hypotézu o příznivých účincích CLA při metabolickém syndromu.
- Podávání vitamínu E u HHTg potkanů snížilo lipoperoxidaci v séru i v myokardu, zvýšilo koncentraci α -tokoferolu v aortě i v myokardu, ale neovlivnilo ostatní složky antioxidačního systému. Podávání α -tokoferolu nevedlo k nežádoucímu snížení hladin γ -tokoferolu.

- Deplece glutathionu nejen zvýšila oxidační stres, ale také významně zhoršila glukózovou toleranci a senzitivitu tukové tkáně k účinku inzulinu u experimentálního modelu metabolického syndromu. Naše výsledky podporují hypotézu, podle které oxidační stres může potencovat metabolické změny spojené s inzulínovou rezistencí a metabolickým syndromem.
- Podání prekursoru glutathionu zvýšilo nejen hladinu glutathionu v séru i tkáních, ale příznivě ovlivnilo další složky antioxidačního systému a snížilo lipoperoxidaci. Podávání prekursoru glutathionu nezlepšilo parametry sacharidového metabolismu ani senzitivitu tkání k účinku inzulinu.
- Podávání α LA zvýšilo koncentraci glutathionu a aktivitu glutathion-dependentních enzymů a SOD a snížilo parametry lipoperoxidace v séru i tkáních, neovlivnilo hladiny α - a γ -tokoferolu v séru ani v myokardu. V kosterním svalu α LA snížila koncentraci triglyceridů a zlepšila senzitivitu k účinku inzulinu a oxidační využití glukózy. Výsledky naznačují pozitivní účinky podávání LA u poruch spojených s oxidačním stresem a metabolickým syndromem.
- Podávání gemfibrozilu vedle výrazného hypolipidemického účinku snížilo lipoperoxidaci v plazmě, myokardu i v játrech. Naproti tomu, podávání gemfibrozilu neovlivnilo snížené koncentrace glutathionu, α - a γ -tokoferolu v myokardu indukované podáváním diety s vysokým podílem sacharózy.

8. SOUHRN

Metabolický syndrom, který je souhrnem metabolických abnormalit, ke kterým patří inzulínová rezistence, dyslipidémie, hypertenze a porušená glukózová tolerance, zvyšuje riziko kardiovaskulárního poškození a rozvoje diabetu 2. typu. Patogenetické mechanismy v rozvoji metabolických poruch nejsou uspokojivě vysvětleny, což znesnadňuje případnou farmakologickou terapii. Poslední studie však přinesly důkazy, že klíčovou roli by mohl hrát oxidační stres, který by mohl být společným patogenetickým mechanismem spojujícím inzulínovou rezistenci, diabetes 2. typu a kardiovaskulární poškození. Ke zvýšení oxidačního stresu může přispívat jak zvýšená tvorba volných radikálů, tak snížená aktivita antioxidačního ochranného systému. Místem skutečného působení antioxidantů a poškození volnými radikály jsou především tkáně, proto byly provedené studie zaměřeny na sledování tkáňových parametrů oxidačního stresu u experimentálních modelů metabolického syndromu.

Soubor několika rizikových kardiovaskulárních onemocnění – výrazná hypertriglyceridémie, zvýšené hladiny NEMK, zhoršená glukózová tolerance a mírná hypertenze u experimentálních modelů metabolického syndromu, zvýšil lipoperoxidaci v aortě a myokardu a výrazně snížil potenciál antioxidačních systémů v aortě i myokardu. Zvýšený oxidační stres v aortě byl spojený se sníženou dostupností NO. Rozvoj těchto poruch byl dále potencován přítomností obezity a přibývajícím věkem. Výsledky u HHTg i diabetických potkanů potvrdily, že sérové a tkáňové koncentrace antioxidantů mohou být odlišné. Zvýšení oxidačního stresu v játrech u experimentálního modelu nealkoholické jaterní steatózy transgenních SREBP-1a potkanů vedlo v pozdějším věku zvířat k rozvoji steatohepatitidy.

Výsledky potvrzují, že oxidační stres je společnou komponentou, která provází metabolický syndrom a která se může podílet v rozvoji metabolických poruch a kardiovaskulárního poškození při metabolickém syndromu.

V další části práce byly sledovány možnosti ovlivnění oxidačního stresu nutriční a farmakologickou intervencí. Příznivé účinky na metabolický syndrom mělo podávání CLA, která zlepšila oxidační stres v játrech, snížila tělesnou hmotnost i množství viscerální tukové tkáně a zlepšila senzitivitu k účinku inzulínu. Podávání vitamínu E, který je důležitým liposolubilním antioxidantem, potvrdilo jeho ochrannou roli pro lipidy a membrány před nežádoucí lipoperoxidací. Za závažné považujeme nálezy, které ukázaly, že podávání vitamínu E zvýšilo koncentrace tohoto antioxidantu v arteriální stěně i myokardu, ale neovlivnilo další komponenty antioxidačního systému. U modelu nedostatečně

kompenzovaného diabetu, který je provázen hyperglykemií, byly v aortách zvýšené koncentrace a- i g-tokoferolu spojeny se sníženými koncentracemi glutationu, antioxidačních enzymů a zvýšenou lipoperoxidací. Tyto nálezy mohou vysvětlit neúspěchy v ovlivnění rizika kardiovaskulárních komplikací zjištěné v klinických studiích.

Klíčovou komponentou antioxidačního systému tvoří glutation. Příznivý vliv na oxidační stres spojený s metabolickým syndromem mělo podávání prekursoru glutationu, které zvýšilo nejen hladinu glutationu, ale ovlivnilo další složky antioxidačního systému a snížilo lipoperoxidaci. Naopak deplece glutationu nejen zvýšila oxidační stres v séru i tkáních, ale také významně zhoršila glukózovou toleranci a senzitivitu k účinku inzulinu u experimentálního modelu metabolického syndromu. Oxidační stres tak může potencovat metabolické změny spojené s metabolickým syndromem. Pozitivní účinky u poruch spojených s oxidačním stresem a metabolickým syndromem měla také kyselina lipoová, která nejen zlepšila parametry oxidačního stresu v myokardu, ale také snížila koncentraci triglyceridů a zlepšila senzitivitu tkání k účinku inzulinu. Studie s podáváním jednotlivých antioxidantů potvrdily, že antioxidanty tvoří systém, ve kterém tyto látky navzájem spolupracují a ovlivňují se.

Hypolipidemická terapie podáváním gemfibrozilu snížila lipoperoxidaci, ale neolivila hladinu antioxidantů v myokardu a játrech. Hypolipidemická léčba při závažné hypertriglyceridémii nemusí být dostatečná pro zvýšení všech antioxidačních systémů ve tkáních.

Získané poznatky ukazují, že oxidační stres ve tkáních dobře koreluje se závažností jednotlivých poruch metabolického syndromu a měl by se stát cílem nutriční a farmakologické terapie, která by ovlivnila více komponent antioxidačního systému.

9. LITERATURA

1. Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, Chaves FJ, Saez G, Redon J – Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Hum Hypertens* **21**, 2007, 68-75
2. Aebi H – Catalase in vitro. *Method Enzymol* **105**, 1984, 121-6
3. Alberti KG, Zimmet PZ – Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* **15**, 1998, 539-553
4. Alp NJ, Channon KM – Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(3): 2004, 413-420)
5. Andreoli MF, Gonzalez MA, Martenelli MI, Mocchiutti NO, Bernal CA – Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. *Nutrition* **25**, 2009, 445-452
6. Arab K, Rossary A, Soulere L, Steghens JP – Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induced glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Brit J Nutr* **96**, 2006, 811-819
7. Atli T, Keven K, Avci A, Kutlay S, Turkcapar N, Varli M – Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **39**(3), 2004, 269-275
8. Bahcecioglu et al.- Levels of serum vitamin A, alpha-tocopherol and malondialdehyde in patients with non-alcoholic steatohepatitis: relationship with histopathologic severity. *Int J Clin Pract* **59**, 2005, 318-323
9. Bartnik M, Norhammar A, Rydén L – Hyperglycaemia and cardiovascular disease. *J Inter Med* **262**, 2007, 145- 156
10. Bast A, Haenen GR – Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* **17**, 2003, 207-13
11. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R – Advanced glycation end products and vascular inflammation: implication for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc.Res.* **63**, 2004, 582-592
12. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA – Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 1990, 1620-1624
13. Becuwe P, Bianchi A, Keller JM, Dauca M: Effects of the peroxisome proliferator clofibrate on superoxide dismutase expression in the human HepG2 hepatoma cell line. *Biochem Pharmacol* **58**, 1999, 1025-1033
14. Bernard C, Merval R, Esposito B, Tedqui A – Resistance to endotoxic shock in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **31**, 1998, 1350-56

15. Berson SA, Yalow RS – Insulin „antagonists“ and insulin resistance. *Diabetes Mellitus: Theory and practise*. M Ellenberg and H Rifkin, McGraw-Hill, New York, 1970, pp. 388-423
16. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A – The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* **29**, 1997, 315-331
17. Bohlen HG – Protein kinase betaII in Zucker obese rats compromises oxygen and flow-mediated regulation of nitric oxide formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: 2004, H492-H497
18. Bonnefont –Rousselot D – Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**, 2002, 561-568
19. Boulomieu A, Marumo T, Lafontan M, Busse R – Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* **13**, 1999, 1231-1238
20. Bowie A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH – Glycosylated low density lipoproteins is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* **102**, 1993, 63-67
21. Bravi MC, Armiento A, Laureáti O, Cassone-Faldetta M, De Luca O, Moretti A, De Mattia G – Insulin decreased intracellular oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **55**, 2006, 691-5
22. Brownlee M – Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 2001, 813-820
23. Brownlee M – The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia* **46**, 2005, 1615-25
24. Calder PC et al – The relationship between fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**, 2007, 327-336
25. Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ – Gemfibrozil decreased atherosclerosis in experimental diabetes in association with a reduction in oxidative stress and inflammation. *Diabetologia* **49**, 2006, 766-774
26. Camera E, Picardo M – Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **781**, 2002, 181-206
27. Cardova F, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ – Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* **38**, 2008, 505-10
28. Carley AN, Severson DL – Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochim Biophys Acta* **1734**, 2005, 112-26
29. Catignani GL – An HPLC method for the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in plasma or serum. *Method in Enzymology* **123**, 1986, 215-19
30. Ceriello A, Motz E, Giugliano D – Vitamin C and hypertension. *Lancet* **355**, 2000, 1271-72

31. Ceriello A, Motz E – Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 2004, 816-823
32. Ceriello A – Postprandial hyperglycemia and diabetes complications. *Diabetes* **54**, 2005, 1-7
33. Ceriello A – Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protect the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* **17**, 2006, 510-18
34. Cerillo A – Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* **31**, 2008, S181-S184
35. Concetti A, Massei P, Rotilio G, Brunovi M, Rachmilewitz EA – Superoxide dismutase in red blood cells: method of assay and enzyme content in normal subjects and patients with beta-thalassemia. *J Lab Clin Med* **87**(6), 1976, 1057-1064
36. Cooper JDH, Thadwal R, Cooper MJ – Determination of vitamin E in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* **690**, 1997, 355-58
37. Coort SL, Bonen A, van der Vusse GL, Blaty JF, Luken JJ – Cardiac substrate and metabolism in obesity and type-2 diabetes: Role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol Cell Biochem* **19**, 2006,
38. Cosentino F, Patton S, Duscio LV, Werner ER, Wernerfeldmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF – Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* **101**, 1998, 1530-1537
39. Day CP, James OF - Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* **27**, 1998, 1463-1466
40. Dekker JM, Girman C, Rhodes T, Nijpels G, Stehouwer CD, Bouter LM, et al – Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the Hoorn Study. *Circulation* **12**, 2005, 666-673
41. DeLany JP, Bloum F, Truett AA, Scimeca JA, West DB: Conjugated linoleic acid reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **276**, 1999, R1172-R1179
42. De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armiento A, Ferri C, Baldami F – Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **47**, 1998, 993-7
43. Devaraj S, Wang-Polagruto J, Keen CL, Jialal I – High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism* **57**, 2008, 867-70
44. Divišová J, Kazdová L, Hubová M, Meschisvilli E - Relationship between insulin resistance and muscle triglyceride content in nonobese and obese experimental models of insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 2002, 440-5

45. Dusting GJ, Selemidis S, Jiang F – Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**(suppl.1), 2005, 97-103
46. Economide PA, Khaodhiar L, Caselli A et al – The effect of vitamin E on endothelial function of micro- and macrocirculation and left ventricular function in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes* **54**, 2005, 204-211
47. Edelsteinová S, Kyselovič J, Klimeš I, Šeböková E, Kováčsová B, Kristek F, Mitková A, Vrána A, Švec P - Effects of marine fish oil on blood pressure and vascular reactivity in the hereditary hypertriglyceridemic rat. *Ann N Y Acad Sci* **683**, 1993, 353-356
48. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM – Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes* **52**, 2003, 1-8
49. Fábry P – Některé modifikace laboratorních diet s různým podílem hlavních živin. *Čs Fyziol* **10**, 1961, 164-166
50. Ferrannini E, Iozzo P – Is insulin resistance atherogenic? A review of the evidence. *Atherosclerosis Supplements* **7**, 2006, 5-10
51. Ferré P – The biology of peroxisome proliferator-activated receptors. Relationship with lipid metabolism and insulin secretion. *Diabetes* **53**, 2004, S43-S50
52. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH – A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 1957, 497-509
53. Ford ES, Mokdad AH, Gilda WH, Brown DW – The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* **52**(9), 2003, 2346-52
54. Ford ES – Prevalence of metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* **28**, 2005, 2745-9
55. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI – The central role of glutathione in the pathophysiology of human disease. *Arch Physiol Biochem* **113**(4-5), 2007, 234-58
56. Frohe L, Gunzler WA – Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol* **105**, 1984, 1141-1121
57. Fruchart JC – PPARs, metabolic disease and atherosclerosis. *Pharmacol Res* **44**, 2001, 345-352
58. Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M – Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J* **70**, 2006, 1437-42
59. Furukawa LN, Kushi T, Asagani T et al – Variation in insulin sensitivity in spontaneously hypertensive rats from different sources. *Metabolism* **47**, 1998, 493-96

60. Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR – Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clinical science* **92**, 1997, 361-365
61. Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnel JP, et al – Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, 2007, 904-11
62. Gentile CL, Pagliassotti MJ - The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* **19**, 2008, 567-576
63. Golda V, Higertová J – Development of lipid and glycid abnormalities in genetically hypertensive obese Koletsky rats and in their lean siblings. *Acta Medica (Hradec Králové)* **41**, 1998, 163-166
64. Grattagliano I, Caraceni P, Calamita G, Ferri D, Gargano I, Palasciano G, Portincasa P – Severe liver steatosis corelates with nitrosative and oxidative stress in rats. *Eur J Clin Invest* **38**, 2008, 523-530
65. Green K, Brand MD, Murphy MP – Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* **53**(Suppl), 2004, S110-S118
66. Green L, Wagner D, Glogowski I, Skipper P, Wishnok I, Tannenbaum S – Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. *Analytical Biochem* **126**, 1982, 131-38
67. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M – NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* **86**, 2000, 494-501
68. Griendling KK, FitzGerald GA – Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **108**, 2003, 1912-1916
69. Griffin MD, Sander TA, Davies IG, Morgan LM, Millward DJ, Lewis F, Slaughter S, Cooper JA, Miller GJ, Griffin BA - Effects of altering the ration of dietary n-6 to n-3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45-70 y: the OPTILIP Study. *Am J Clin Nutr* **84**, 2006, 1290-98
70. Groop L – Genetics of the metabolic syndrome. *Brit J Nutr* **83** (Suppl 1), 2000, S39-S48
71. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, et al. American Heart Association; National Heart, Lung and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**, 2005, 2735-52
72. Guerre-Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Hebert JM, Winegar DA, Wilson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B: Peroxisome proliferators-activated receptors improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* **275**, 2000, 16638-16642

73. Gustafson B, Hammarstedt A, Anderson ChX, Smith U – Inflamed adipose tissue: A culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* **27**, 2007, 2276-2283
74. Guzik TJ., Mussa S., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R., Channon KM.- Mechanism of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NADPH oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**, 2002, 1656-62
75. Haafte RI, Haenen GR, Velo ChT, Bast A – Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metabolism* **2-3**, 2003, 215-253
76. Haidara MA, Yassin HZ, Rateb M, Ammar H, Zorkami MA – Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol* **4**, 2006, 215-227
77. Han JC, Han GZ –A procedur for quantitative determination of tris (2-carboxyethyl)phosphine an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal Biochem* **220**, 1994, 5-10
78. Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M et al – Insufficient glycemic control increase nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolatér from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **21**, 1998, 1310-16
79. Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR – A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **xx**, 2009, 1-6
80. Houseknecht KL, Vanden Neucel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA: Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 1998, 678-682
81. Hsueh WA, Quinones MJ – Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol* **92**(4A), 2003, 7J-10J
82. Hu D, Serrano F, Oury TD, Klann E – Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neuroscience* **26**, 2006, 3933-41
83. Huang HY, Caballero B, Chang S, Alberg AJ, Semba RD, Schneyer CR, Wilson RF, Cheby TY, Vassy J, Prokopowicz G, Barnes GJ, Bass EB – The efficacy and safety of multivitamin and minerale suplement use to prevent cancer and chronic disease in adults: a systematic review for a National Institute of Health state-of-the-science conference. *Ann Intern Med* **145**, 2006, 372-85
84. Chan WB, Ma RC, Chan NN, Ng MC, Lee ZS, Lai CW, Tong PC SO WY, Chan JC – Increased leptin concentrations and lack of gender difference in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* **64**, 2004, 93-98
85. Chen M, Nagase M, Fujita T, Masaki T, Sawamura T – Diabetes enhances lecithin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: Possible role of LOX-1 ligand and AGE. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **287**(4), 2001, 962-68

86. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL – Antioxidant effect of vitamins C and E associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* **38**, 2001, 606-11
87. Chicco A, Bernal C, Soria A, Giangrossi G, Lombardo Y – Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipidemic rats. *Nutrition Research* **19**, 1999, 291-293
88. Chicco A, Soria A, Fainstein-Day P, Gutman R, Lombardo YB – Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. *Horm Metab Res* **26**, 1994, 397-403
89. Chisolm GM., Steinberg D. – The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* **28**, 2000, 1815-26
90. Ignarro LJ – Nitric oxide: a unique endogenous signalling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* **19**, 1999, 51-71
91. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H – High glucose level and free acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NADPH oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 2000, 1939-1945
92. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sonta N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H – Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NADPH oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol* **14**(8), 2003, S227-S232
93. Inoue I, Noji S, Awata T et al – Bezafibrate has an antioxidant effect: peroxisome proliferator activated receptor α is associated with Cu, Zn superoxide dismutase in the liver. *Life Science* **63**, 1998, 135-144
94. Jain SK, Levine SN – Elevated lipid peroxidation and vitamin E-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radic Biol Med* **18**, 1995, 337-341
95. Jay D., Hitomi H., Griedling KK. – Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 2006, 183-192
96. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A – Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practise. *Cardiovascular Diabetology* **4**, 2005, 2-11
97. Kazdová L, Žák A, Vrána A - Increased lipoprotein oxidability and aortic lipid peroxidation in an experimental model of insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **827**, 1997, 521-525
98. Kim HK, Kim SR, Ahn JY, Cho IJ, Yoon CS, Ha TY – Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **51**, 2005, 8-15

99. Kim MS, Park IS, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY et al – Antiobesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **10**, 2004, 727-733
100. Kiyose C, Saito H, Ueda T, Igarashi O – Simultaneous determination of alpha- and gamma-tocopherol and their quinones in rats plasma and tissues using reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol* **47** (2), 2001, 102-7
101. Knott HM., Brown BE., Davies MJ., Dean RT. – Glycation and glycoxilation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes: formation of modified and oxidized particules. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2003, 3572-82
102. Koh KK, Quon MJ, Rosenson RS, Chung WJ, Han SH - Vascular and metabolic effects of treatment of combined hyperlipidemia: focus on statins and fibrates. *Int J Cardiol* **29**, 2008, 149-159
103. Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschütter A, Beisiegel U – Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein *J Lipid Res* **37**, 1996, 1436-48
104. Kontush A, Spranger T, Reich A, Baum K, Beisiegel U – Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: the role of α -caroten and γ -tocopherol. *Atherosclerosis* **144**, 1999, 117-122
105. Koruk M, Taysi S, Savas MC – Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* **34**, 2004, 57-62
106. Kritchevsky D et al: Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and regression of lesions. *Lipids* **39**, 2004, 611-616
107. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Tiskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT – The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* **288**, 2002, 2709-2716
108. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG – Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension *J Clin Invest* **111**, 2003, 1201-9
109. Lee AY, Chung SS – Contribution of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract, *FASEB Journal*. **13**(1), 1999, 23-30
110. Lewis MR, Tracy RP - The role of the immune system in the insulin resistance syndrome. *Curr Diab Rep* **2**, 2002, 96-99
111. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP – Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* **106**, 2002, 987-992

112. Loria P, Lonardo A, Targner G – Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis. *Clinical Science* **115**, 2008, 1-12
113. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ – Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 1951, 265-275
114. Malmberg K, Ryden L, Wedel H et al – DIGAMI 2 Investigators. Intense metabolic control by means of insulin in patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction (DIGAMI 2): effects on mortality and morbidity. *Eur Heart J* **26**, 2005, 650-661
115. Martin-gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C – Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic.Biol.Med.* **34**, 2003, 1563-74
116. McGarry JD - Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2002, 7-18
117. Mehta JL, Rasouli N, Sinha AK, Molavi B – Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Inter J Biochem Cell Biol* **38**, 2006, 794-803
118. Miller ER, Pastor-Bariuso R, Dalal D, Riemersma R, Appel LJ, Guallar E – Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Int Medicine* **142**, 2004, 37-46
119. Moloney F, Toomey S, Noone E, Nugent A, Allan B, Loscher ChE, Roche HM - Antidiabetic effects of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes* **56**, 2007, 574-582
120. Muniyappa R, Srinivas PR, Ram JL, Walsh MF, Sowers JR – Calcium and protein kinase C mediate high-glucose-induced inhibition of inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **31**, 1998, 289-95
121. Nagao K, Inoue N, Wang Y, Shirouchi B, Yanagita T – Dietary conjugated linoleic acid alleviates nonalcoholic fatty liver disease in Zucker (fa/fa) rats. *J Nutr* **135**, 2005, 9-13
122. Nagyová A, Ginter A – Hladiny glutationu v krvi vegetariánov. *Klin Biochem Metab* **3**, 1995, 122-24
123. Naito C, Kawamura M, Yamamoto Y – Lipid peroxides as the initiating factor of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* **676**, 1993, 27-45
124. Nakamura T, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, Dohi K, Makita Z, Vlassara H, Bucala R – Immunohistochemical localization of advanced glycation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am.J.Pathol.* **143**, 1993, 1649-56
125. Nakagawa K, Kanno H, Miura Y – Detection and analyse of ascorbyl radical in cerebrospinal fluid and serum of acute lymphoblastic leukemia: *Analytical Biochemistry* **254**, 1997, 31-35

126. Napoli C, de Nigris F, Palinski W – Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* **82**(4), 2001, 674-82
127. Naruse K, Rask-Madsen Ch, Takahara N, Ha S, Suzuma K, Way KJ, Jacobs JR, Clermont AC, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine AB, King GL – Activation of vascular protein kinase C- β inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* **55**, 2006, 691-8
128. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M – Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**, 2000, 787-790
129. Noto A, Zahradka P, Yurkova N, Xie X, Truong H, Nitschmann E, Ogborn MR, Taylor CG: Dietary conjugated linoleic acid decreased adipocyte size and favorably modifies adipokine status and insulin sensitivity in obese, insulin resistant rats. *Metabolism* 2007, **56**, 1601-11
130. O'Brien KD, Chait A – The biology of the artery wall in atherogenesis. *Med Clin North Am.* **78**, 1994, 41-67
131. O'Brien ML, Twaroski TP, Cunningham ML, Glauert HP, Spear BT: Effect of peroxisome proliferators on antioxidant enzymes and antioxidant vitamins in rats and hamsters. *Toxicol Sci* **60**, 2001, 271-278
132. Örvall M, Sundlöf G, Vessby B – Gamma-, but not alpha-tocopherol levels in serum are reduced in coronary heart disease patients. *J Intern Med* **239**, 1996, 111-117
133. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ – alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* **19**, 1995, 227-250
134. Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G – Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* **136**, 2006 3022-6
135. Paolisso G, D'Amore A, Volpe C et al – Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin dependent diabetic patients. *Metab Clin Exp* **43**, 1426-1429, 1994
136. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Canethon MR, Heymsfield SB – The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* **163**, 2003, 427-436
137. Peelman F, Waelput W, Iserentant H, Lavens D, Eyckerman S, Zabeau L, Tavernier J – Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog.Lipid Res.* **43**, 2004, 283-301
138. Perseghin G, Lattuada G, De Gobelli F, et al – Increased mediastinal fat and impaired left ventricular energy metabolism in men with newly found fatty liver. *Hepatology* **47**, 2007, 51-58

139. Peterson KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI – Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2004, 664-671
140. Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, et al. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1997, **46**, S9-S13
141. Pleiner J, Schaller G, Mittermayer F, Bayerle-Eder M, Roden M, Wolzt M – FFA-induced endothelial dysfunction can be corrected by vitamin C. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **87**, 2002, 2913-2917
142. Pouwels MJ, Tack CJ, Span PN, Olthaar AJ, Sweep CG, Huvers FC, et al – Role of hexosamines in insulin resistance and nutrient sensing in human adipose and muscle tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2004, 5132-7
143. Pravenec M, Kurtz TW – Genetics of Cd36 and the hypertension metabolic syndrome. *Seminar in Nephrology* **22** (2), 2002, 148-153
144. Pravenec M, Landa V, Musilova A, Kren V, Kazdova L, Altman TJ, Glazier AM, Ibrahimi A, Abumrad NA, Qi N, Wang JM, Stlezin EM, Kurtz TW – Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat.Genet* **27**(2), 2001, 156-158
145. Pravenec M, Zidek V, Šimáková M, Křen V, Křenová D, Horký K et al – Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *J Clin Invest* **103**, 1999, 1651-57
146. Puddu P, Puddu GM, Galletti L, Cravero E, Muscari A – Mitochondria dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis. *Cardiology* **103**, 2005, 137-141
147. Qi N, Kazdova L, Zidek V, Landa V, Kren V: Pharmacogenetic evidence that Cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone *J Biol Chem* **277**, 2002, 48501-507
148. Qi N, Wang J, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Kazdova L, Pravenec M, Kurtz TW – A new transgenic rat model of hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hypertension* **45**, 2005, 1004-1011
149. Qin F, Lennon-Edwards S, Lancel S, Biolo A, Siwik DA, Pimentel DR, Dorn GW, Kang YJ, Colucci WS – Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and independent-phases of myocardial remodeling, and prevents the progression to overt heart failure in transgenic mice. *Circ Heart Fail* **16**, 2009
150. Rabini RA, Fumelli P, Galassi R, Dousset N, Taus M, Feretti G, Mazzanti L, Curatola G, Solera ML, Valdiguié P – Increased susceptibility to lipid oxidation of low-density lipoproteins and erythrocyte membranes from diabetic patients. *Metabolism* **43**, 1994, 1470-74
151. Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK – Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular muscle cells. *FASEB J.* **17**, 2003, 417-425

152. Rasouli N, Raue U, Miles LM, Lu T, Di Gregorio GB, Elbein SC, et al. – Pioglytazon improves insulin sensitivity trough reduction in muscle lipid and redistribution of lipid into adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **288**(5), 2005, E930-E934
153. Reilly MP, Iqbal N, Schutta M, Wolfe ML, Scally M, Localio AR, Rader DJ, Kimmel SE – Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **89**, 2004, 3872-3878
154. Reaven GM: Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1988, 1595-1607
155. Reaven GM – Role of insulin resistance in human disease (syndrom X): an expanded definition. *Annu Rev Med* **44**, 1993, 121-31
156. Reaven PD, Herold DA, Barnett J, Edelman S – Effects of vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation, in NIDDM. *Diabetes Care* **18**, 1995, 807-816
157. Reaven GM – Insulin resistance, the insulin resistance syndrome and cardiovascular disease. *Panminerva Med* **47**, 2005, 201-10
158. Rector RS, Thyfalt JP, Wei Y, Ibdah JA – Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update *World J Gastroenterol* **14**, 2008, 185-192
159. Riserus U, Vessby B, Arnlov J, Basu S: Effect of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation and proinflammatory markers in obese men. *Am J Clin Nutr* **80**, 2004, 279-283
160. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Piccoli A, Valentini U, Cimino A, Salvetti M, De Ciuceis C, Tiberio GA, Giulini SM, Sleiman I, Monteduro C, Rosei EA – Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Hypertens.* **19**, 2001, 913-919
161. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND – Oxidative stress and dysregulation of NADPH oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* **55**, 2006, 928-34
162. Roberts CK, Shindhu KK – Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Science* **84**, 2009, 705-712
163. Rolo AP, Palmeira CM – Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* **212**, 2006, 167-178
164. Ross R. – Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N.Engl. J. Med.* **340**, 2004, 115-126
165. Rudish A, Tirosh A, Potashnik R et al: Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 1998, **47**, 1562-69
166. Ruiz Rejón F, Martin-Pena G, Granado F, Ruiz-Galiana J, Blanco I, Olmedilla B – Plasma status of retinol, alpha- and gamma-tocopherols, and main carotenoides to first myocardial infarction: case control and follow-up study. *Nutrition* **18**, 2002, 26-31

167. Sane T, Knudsen P, Vuorinen-Markkola H, Yki-Jarvinen H, Taskinen MR: Decreasing triglycerides by gemfibrozil therapy does not affect the glucoregulatory or antilipolytic effect of insulin in nondiabetic subjects with mild hypertriglyceridemia. *Metabolism* **44**, 1995, 589-596
168. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A – oxidative stress parameters in type 1, type 2 and insulin-treated type 2 diabetes mellitus, insulin efficiency. *Clin.Chim.Acta* **321**, 2002, 89-96
169. Sahfrir E – Animal model of non-insulin-dependent diabetes. *Diab Metab Rev* **8**, 1998, 179-208
170. Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Pakdel FG, Khademvatani K – Cardioprotective effect of vitamin E: rescues of diabetes-induced cardiac malfunction, oxidative stress and apoptosis rat. *J Diab Compl* **23**, 2009, 310-316
171. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D – Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 in cultured human endothelial cells and in mice: a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J.Clin.Invest.* **96**, 1995, 1395-1403
172. Schrauwen P, Hesselink MK – Oxidative capacity, lipotoxicity and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* **53**(6), 2004, 1412-17
173. Schreuder TC, Verwer BJ, van Nieuwkerk CM, Mulder CJ - Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol* **28**, 2008, 2474-86
174. Schriener SE et al – Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308**, 2005, 1909-1911
175. Schwarz EA, Reaven MD – Molecular and signaling mechanisms of atherosclerosis in insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin N Am* **35**, 2006, 525-549
176. Singh U, Jialal I – Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutrition Reviews* **66**(11), 2008, 646-657
177. Sjogren P, Basu S, Rosell M, de Faire U, Vessby et al - Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2005, 2580-2586
178. Skyrme-Jones RA, O'Brien RC, Berry KL, Meredith IT – Vitamin E supplementation improves endothelial function in type 1 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *J. Am. Coll Cardiol.* **36**, 2000, 94-102
179. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TH – Lipoic acid as a potential therapy for chronic disease associated with oxidative stress. *Curr Med Chemistry* **11**, 2004, 1135-46

180. Soriano F, Virag L, Szabo C – Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose)polymerase activation. *J Mol Med* **79**, 2001, 437-448
181. Stamfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willet WC – Vitamin E consumption and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* **328**, 1993, 1444-49
182. Stefek M, Sotnikova R, Okrouhlicova L, Volkovova K, Kucharska J et al – Effect of dietary supplementation with the pyrodoindole antioxidant stobadine on antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. *Acta Diabetologica* **37**, 2000, 111-117
183. Steinberg H, Baron A – Vascular function, insulin resistance and fatty acid. *Diabetologia* **45**, 2002, 623-634
184. Stephen N et al - Randomised control trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study. *Lancet* **347**, 1996, 781-786
185. Stojiljkovic MP, Lopes HF, Zhang D, Morrow JD, Goodfried TL, Egan BM – Increasing plasma fatty acids elevates F2-isoprostanes in humans: implications for the cardiovascular risk factor cluster. *J.Hypertens.* **20**, 2002, 1215-1221
186. Storlien LH, Jenkins AB, Chrisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW – Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**, 1991, 280-289
187. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, et al – Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* **287**, 2002, 1420-26
188. Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R – Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of alpha-tocopherol and ascorbate. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* **15**, 1995, 1616-24
189. Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, et al – Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2004, 3381-86
190. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE – Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* **50**, 2001, 851-860
191. Šeda O, Šedová L, Oliarynyk O, Kazdová L, Křenová D, Corbeil G, Hamet P, Tremblay J, Křen V – Pharmacogenomics of metabolic effects of rosiglitazone. *Pharmacogenomics* **9**, 2008, 141-155
192. Škrha J, Šindelka G, Kvasnička J, Hilgertová J – Insulin and fibrinolysis influenced by vitamin E in obese type 2 diabetes mellitus. *Diab Res Clin Pract* **44**, 1999, 27-33
193. Štípek S a kolektiv – v knize Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Avicenum Praha 2000

194. Tanaka MM, Mokhtari GK, Terry RD, Balsam LB, Lee KH, Kofidis TM – Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase suppresses ischemia-reperfusion injury and subsequent development of graft coronary artery disease in murine cardiac grafts. *Circulation* **110**, II, 2004
195. Targher G – Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens. *Diabet Med* **24**, 2007, 1-6
196. Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudish A – Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **274**, 1999, 10595-10602
197. Tkáč I, Molčányiová A, Javorský M, Kozárová M - Fenofibrate treatment reduces circulating conjugated diene level and increases glutathione peroxidase activity. *Pharmacol Res* **53**, 2006, 261-264
198. Tohyama YTT, Yamamura H – B cell response to oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 2004, 835-839
199. Touyz RM – Reactive oxygen species and angiotensinII signaling in vascular cells: implication in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* **37**, 2004, 1263-73
200. Traber MG – Vitamin E regulatory mechanism. *Annu Rev Nutr* **27**, 2007, 347-62
201. Traber MG – Heart disease and single-vitamin supplementation. *Am J Clin Nutr* **85**, 2007, 293S-299S
202. Traber MG, Atkinson J – Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* **43**, 2007, 4-15
203. Tripathy D, Monanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P – Elevation of free fatty acid induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetologia* **52**, 2003, 2882-2887
204. Venugopal SK, Devaraj S, Yang T, Jialal I – Alpha-tocopherol decreased superoxide anion release in human monocytes under hyperglycemic conditions via inhibition of protein kinase C- α . *Diabetes* **51**, 2002, 3049-3054
205. Verges B – New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **31**, 2005, 429-39
206. Vrana A, Kazdova L – Insulin sensitivity of rat adipose tissue and of diaphragm in vitro: effect of the type of dietary carbohydrate. *Life Sci* **9**, 1970, 257-65
207. Vrana A, Kazdova L – The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: An experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* **22**, 1990, 2579
208. Vrána A, Kazdová L, Dobešová Z, Kuneš J, Křen V, Bílá V, Štolba P, Klimeš I – Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrates *Ann NY Acad Sc* **683**, 1993, 57-68

209. Wanless IR, Lentz JS - Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* **12**, 1990, 1106-1110
210. Ward PJ, Piloto, Hatherill JR – Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. *J Clin Invest* **76C** 1985, 517-27
211. Wautier M, Considine RV, Yudkin JS, Peiffer F, De Leeuw I, Van Gaal LF – Leptin levels in type 2 diabetes: associations with measures of insulin resistance and insulin secretion. *Horm.Metab.Res.* **35**, 2003, 92-96
212. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL – Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, 2001, E685-E694
213. Way KJ, Katai N, King GL – Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Med* **18**, 2001, 945-959
214. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. – Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 2004, 1047-53
215. Williams S, Cusco J, Roddy M, Johnstone M, Creager M – Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J.Am.Coll.Cardiol* **27**, 1996, 567-574
216. de Winter MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH – Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**, 2005, 904-914
217. Wollin SD, Jones P - α -Lipoic acid and cardiovascular disease. *J Nutr* **133**, 2003, 3327-30
218. Wolf G – How an increased intake of alpha-tocopherol can suppress the bioavailability of gamma-tocopherol. *Nutrition Reviews* **64**, 2006, 295-299
219. Woodman RJ, Chew GT, Watts GE – Mechanism, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid-regulating therapy. *Drugs* **65**(1), 2005, 31-74
220. Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton JR, Turner ND – Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004, **134**, 489-92
221. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M – Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J.Biol.Chem.* **276**, 2001, 25096-25100
222. Yi X, Maeda N – α -Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E-deficient mice fed high/low-cholesterol diet. *Diabetes* **55**, 2006, 2238-2244
223. Yki-Järvinen H – Role of insulin resistance in pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia* **38**, 1995, 1378-1388

224. Yki-Järvinen H – The fatty liver and insulin resistance. *Curr Mol Med* **5**, 2005, 287-295
225. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S – Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* **38**, 1995, 201-210
226. Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND – Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: Effect of antioxidant-rich diet. *Journal of hypertension*, **22**, 2004, 2025-2033

10. SEZNAM ZKRATEK

AA	kyselina askorbová
AGE	konečné produkty pokročilé glykace (advanced glycosylation endproducts)
ALT	alaninaminotransferáza
AP-1	transkripční faktor AP-1
AST	aspartátaminotransferáza
AT1	receptory 1. typu prot angiotenzin II
AUC	plocha pod křivkou (area under curve)
BH4	tetrahydrobiopterin
BMI	body mass index
BSO	buthionine sulfoximine
CAT	kataláza
CD	konjugované dieny
cGMP	cyklický guanozin-3',5'-monofosfát
CLA	konjugovaná kyselina linolová
CRP	C-reaktivní protein
DAG	diacylglycerol
DHLA	dihydrolipoová kyselina
DMT1	diabetes mellitus 1. typu
DMT2	diabetes mellitus 2. typu
α E	α -tokoferol
γ E	γ -tokoferol
ELISA	imunosorbentní enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
eNOS	endoteliální syntéza oxidu dusnatého
FFA	volné mastné kyseliny (free fatty acid)
GEE	glutation etyl ester
GLUT	glukózový transportér
GPx	glutationperoxidáza
GR	glutationreduktáza
GSH	redukováný glutation
GSSG	oxidovaný glutation
GST	glutationtransferáza
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HDL-C	HDL cholesterol
HHTg	hereditární hypertriglyceridémie
4-HNE	4-hydroxy-2,3- <i>trans</i> -nonenal
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
ICAM	mezibuněčná adhezní molekula (intercellular adhesion molekule)
IDL	lipoprotein o střední hustotě (intermediate density lipoprotein)
ICHS	ischemická choroba srdeční
iNOS	inducibilní syntéza oxidu dusnatého
JNK/SAPK	NH ₂ -terminal Jun kinase/stress activated protein kinase
LA	kyselina lipoová
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LOO	lipidový alkylperoxylový radikál
LOOH	lipidový hydroperoxid
LOX-1	lectin-like oxLDL receptor
MAPK	typ proteinkinázy (mitogen-activated protein kinase)

MCP-1	typ chemoatraktantu pro monocyty (monocyte chemoattractant protein-1)
MDA	malondialdehyd
mmLDL	minimálně modifikované LDL
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAFLD	nealkoholická jaterní steatóza
NASH	nealkoholická jaterní steatohepatitida
NEMK	neesterifikované mastné kyseliny
NFκB	transkripční faktor κ B
NO	oxid dusnatý
OGTT	orální glukózový toleranční test
oxLDL	oxidačně modifikované LDL
PAI	inhibitor plazminového aktivátoru
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
PKC	proteinkináza C
PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxyláza
PPARα	peroxisome proliferator-activated receptor α
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PUFA	polyenové mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acid)
QTL	quantitative trait locus
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SEM	směrodatná odchylka
SFA	saturované mastné kyseliny
SHR	spontánně hypertenzní potkan
SOD	superoxiddismutáza
SREBP-1a	sterol regulatory element-binding protein-1a
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein-1c
TBARS	látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou
Tg	triacylglyceroly (triglyceridy)
TGF-β	transformující růstový faktor (transforming growth factor-β)
αToc	α-tokoferol
γToc	γ-tokoferol
VCAM	vaskulární cytoadhezní molekula (vascular cell adhesion molekule)
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)
VSMC	cévní hladké svalové buňky (vascular smooth muscle cell)

11. PŘÍLOHY

Publikace autora

V. Adámková, JA Hubáček, H Fistulková, **H Malínská**, J Skibová – Genetic determination of an endothelial function and the size of the heart secretions in juvenile hypertensives. *J Appl Biomed* **4**, 2006, 59-65

Malínská H, Oliarynyk O, Hubová M, Zídek V, Landa V, Simáková M, Mlejnek P, Kazdová L, Kurtz TW, Pravenec M – Increased liver oxidative stress and altered PUFA metabolism precede development of non-alcoholic steatohepatitis in SREBP-1a transgenic spontaneously hypertensive rats with genetic predisposition to hepatic steatosis. *Mol Cell Biochem* **335**, 2010, 119-125

1. **Malínská H**, Hubová M, Kazdová L: Vliv hypertriglyceridémie a obezity na koncentrace α - a γ -tokoferolu v aortách potkanů. *DMEV* **2003**, 6, 41
2. **Malínská H**, Oliarynyk O, Kazdová L: Změny tkáňových koncentrací vitamínů E, C a redukovaného glutationu u modelu diabetu 1. typu. *DMEV* **2004**, 7, 32
3. Oliarynyk O, **Malinska H**, Kazdova L: Aging-induced impairment of antioxidant enzyme activity in non-obese model of metabolic syndrome. *Diabetologia* **2004**, 47 (Suppl1), A225
4. **Malínská H**, Oliarynyk O, Kazdová L: Podávání glutathion ethyl esterů zlepšuje antioxidační stav u experimentálního modelu insulinové rezistence. *DMEV* **2005**, 8, 35
5. **Malinska H**, Oliarynyk O, Kazdova L: Glutathione ethyl ester improves antioxidant status in an experimental model of metabolic syndrome. *Atherosclerosis Suppl* **2005**, 6, W9-41
6. **Malinska H**, Oliarynyk O, Cahova M, Kazdova L: Effect of glutathione depletion on oxidative stress and insulin sensitivity in an experimental model of metabolic syndrome. *Diabetologia* **2005**, 48 (Suppl1), A208-9
7. **Malínská H**, Burešová M, Marková I, Kazdová L: Sérové koncentrace adiponektinu ve vztahu k insulinové rezistenci periferních tkání u experimentálních modelů metabolického syndromu. *DMEV* **2006**, 9, 37
8. **Malinska H**, Cahova M, Kazdova L, Pravenec M: Long-term pioglitazone treatment prevent age-related impairment of tissues insulin sensitivity and adiponectin secretion in sucrose fed SHR rats. *Diabetologia* **2006**, 49 (Suppl1), S337
9. **Malínská H**, Cahová M, Kazdová L, Pravenec M: Úloha transportéru mastných kyselin FAT/CD36 v poruchách lipidového metabolismu a utilizace glukózy při insulinové rezistenci. *DMEV* **2007**, 10, 21

10. Oliyarnyk O, **Malinska H**, Burešova M, Kazdova L: Inverse relationship between triglycerides accumulation and glutathione production in the liver in nonobese and obese models of insulin resistance. *Diabetologia* **2007**, 50 (Suppl1), S265
11. **Malínská H**, Maxová M, Hubová M, Kazdová L: Metabolické účinky konjugované kyseliny linolové u experimentálního modelu metabolického syndromu. *DMEV* **2008**, 11, 31-32
12. Oliyarnyk O, **Malinska H**, Maxova M, Kazdova L, Pravenec M: Transgenic expression of human C-reactive protein suppresses adiponectin and induces insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia* **2008**, 51 (Suppl 1), S35
13. **Malínská H**, Maxová M, Kazdová L, Pravenec M: Telmisartan ve srovnání s losartanem zlepšuje inzulínovou rezistenci a dyslipidémii. *DMEV* **2009**, 12, 30-31
14. **Malínská H**, Seidlová H, Urbanová J, Kazdová L: Stanovení gama-tokoferolu a jeho možné využití. *Klinická biochemie a metabolismus* **2009**, 17, 196

Identifikační záznam:

MALÍNSKÁ, Hana. *Úloha oxidačního stresu v patogenezi metabolického syndromu a jeho komplikací. (The role of oxidative stress in the pathogenesis of metabolic syndrome and its complications)*. Praha, 2010. 122 str., 2 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika. Vedoucí práce RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Abstract:

Metabolic syndrome is a common disorder combining obesity, dyslipidemia, hypertension and insulin resistance and is primary risk factor for type 2 diabetes and cardiovascular disease. The pathogenetic mechanism is not fully clarified, but recent studies suggest that oxidative stress could play a key role in the pathogenesis of metabolic syndrome and could be common pathogenic factor underlying insulin resistance, diabetes type 2 and cardiovascular disease. The Thesis focus on oxidative stress in tissues and their metabolic consequences.

Clustering of cardiovascular risk factors – hypertriglyceridemia, elevated FFA, impaired glucose tolerance and hypertension in HHTg rats as a model of metabolic syndrome increased lipoperoxidation and aggravated antioxidant system in arterial wall and myocardium. Obesity and growing age further potentiated these disturbances. Oxidative stress potentiated with glutathione depletion impaired glucose tolerance and reduced adipose tissue insulin sensitivity. Fat accumulation in the liver with increasing oxidative stress in SREBP-1a transgenic rats may play a causal role in the pathophysiology of non-alcoholic steatosis and may participate on progression to steatohepatitis. The metabolic syndrome is characterized by increased oxidative stress in arterial wall, myocardium and liver, a relevant factor contributing to the development of metabolic and cardiovascular disorders.

Nutritional supplementation with conjugated linoleic acid, vitamin E, glutathione ethyl esters or lipoic acid improve oxidative stress and may have a positive effect on abnormalities associated with metabolic syndrome. On the other hand gemfibrozil administration indicate, that this fibrate has both hypolipidemic and antioxidant effect but improved oxidative stress do not have be effective for all components of antioxidant system.

Oxidative stress in tissues well correlates with relevance of metabolic abnormalities accompanying metabolic syndrome and could be a target for nutritional and pharmacologic intervention, that affect more components of antioxidant system.

Keywords: metabolic syndrome, oxidative stress, insulin resistance, antioxidants, cardiovascular disease

Abstrakt:

Metabolický syndrom, který je souhrnem metabolických abnormalit - inzulínové rezistence, dyslipidémie, hypertenze a porušené glukózové tolerance, zvyšuje riziko kardiovaskulárního poškození a rozvoje diabetu 2.typu. Patogenetické mechanismy v rozvoji těchto poruch nejsou uspokojivě vysvětleny. Poslední studie však přinesly důkazy, že klíčovou roli by mohl hrát oxidační stres, který by mohl být společným patogenetickým mechanismem spojujícím inzulínovou rezistenci, diabetes 2.typu a kardiovaskulární poškození. Místem skutečného působení antioxidantů a poškození volnými radikály jsou především tkáně, proto byly provedené studie zaměřeny na sledování tkáňových parametrů oxidačního stresu.

Soubor několika rizikových kardiovaskulárních onemocnění – výrazná hypertriglyceridémie, zvýšené hladiny NEMK, zhoršená glukózová tolerance a mírná hypertenze u experimentálních modelů metabolického syndromu, zvýšil lipoperoxidaci v aortě a myokardu a výrazně snížil potenciál antioxidantních systémů v aortě i myokardu. Rozvoj těchto poruch byl dále potencován přítomností obezity a přibývajícím věkem. Oxidační stres potencovaný deplecí glutationu zhoršil glukózovou toleranci a snížil inzulínovou senzitivitu tukové tkáně. Zvýšení oxidačního stresu v játrech u experimentálního modelu nealkoholické jaterní steatózy transgenních SREBP-1a potkanů vedlo v pozdějším věku zvířat k rozvoji steatohepatitidy. Výsledky potvrzují, že oxidační stres je společnou komponentou, která provází metabolický syndrom a která se může podílet v rozvoji metabolických poruch a kardiovaskulárního poškození při metabolickém syndromu.

Příznivé účinky na oxidační stres mělo podávání CLA, vitamínu E, glutation ethyl esterů i kyseliny lipoové, které tak mohou pozitivně ovlivnit i metabolické poruchy spojené s metabolickým syndromem. Podávání gemfibrozilu mělo hypolipidemický i antioxidantní účinek, který však nebyl dostatečný pro zvýšení všech antioxidantních systémů ve tkáních. Získané poznatky ukazují, že oxidační stres ve tkáních dobře koreluje se závažností jednotlivých poruch metabolického syndromu a měl by se stát cílem nutriční a farmakologické terapie, která by ovlivnila více komponent antioxidantního systému.

Klíčová slova: metabolický syndrom, oxidační stres, inzulínová rezistence, antioxidanty, kardiovaskulární poškození